



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΟΧΕΣΙΝΗΣ STAG2 ΑΠΟ microRNAs.

REGULATION OF COHESIN STAG2 EXPRESSION BY microRNAs.

ΛΙΝΤΖΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΟΧΕΣΙΝΗΣ STAG2 ΑΠΟ microRNAs.

REGULATION OF EXPRESSION OF COHESIN STAG2 BY microRNAs.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ: ΔΟΞΑΚΗΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ

Ερευνητής Γ', Κέντρο Βασικής Έρευνας,
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Τόπος διεξαγωγής της έρευνας: Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής
Νευροβιολογίας, Κέντρο Βασικής Έρευνας, (ΙΙΒΕΑΑ)

Τριμελής Επιτροπή

Δρ. ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΔΟΞΑΚΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Γ', ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ
(ΙΙΒΕΑΑ)

Δρ. ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ (ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ-ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (ΤΒΒ)

Δρ. ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΣΤΑΓΚΟΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (ΤΒΒ)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) από τον Φεβρουάριο έως και τον Δεκέμβριο του 2018.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Επαμεινώνδα Δοξάκη για την εμπιστοσύνη, τη κατανόηση, τις υποδείξεις και την βοήθεια του ως προς την εκπλήρωση της εργασίας και για την θερμή του αντιμετώπιση μέσα στον χώρο του εργαστηρίου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δημήτρη Κουρέτα και τον επίκουρο καθηγητή Δημήτρη Στάγκο για την βοήθεια υλοποίησης της εργασίας και που δέχθηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια τους και τις χρήσιμες υποδείξεις τους, Φαίδωνα, Στέλιο, Όλγα, Δήμητρα και Μαριάννα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και την οικογένεια μου για την υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια και διότι χωρίς αυτούς δε θα μπορούσα να φτάσω μέχρι εδώ.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
Abstract	6
Περίληψη	7
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Κοχυσίνες	8
1.2 Η Κοχυσίνη STAG2.....	15
1.3 microRNAs.....	21
1.4 Σκοπός της Εργασίας	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1 Βιοπληροφορική Ανάλυση	28
2.2 Πειραματικό υλικό	28
2.2.1 Κυτταρικές σειρές.....	28
2.2.2 Φορείς κλωνοποίησης	32
2.3 Κατασκευή των φορέων κλωνοποίησης	35
2.3.1 Απομόνωση του τμήματος DNA 3'UTR του γονιδίου Stag2.....	35
2.3.2 Εισαγωγή του 3'UTR του γονιδίου Stag2 στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECK2	37
2.4 Κλωνοποίηση.....	38
2.4.1 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων για την εισαγωγή πλασμιδίων	38
2.4.2 Μετασχηματισμός κυττάρων.....	39
2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε αποικία (Colony PCR)	39
2.4.4 Καλλιέργεια βακτηρίων	40
2.4.5 Απομόνωση πλασμιδιακών φορέων.....	40
2.4.6 Αποθήκευση μετασχηματισμένων κυττάρων	41
2.5 Διαμόλυνση	41
2.5.1 Διαμόλυνση των κυττάρων HEKA και U2OS με τον φορέα psi-CHECK2™ και με τα ολιγονουκλεοτίδια.....	42
2.6 Ανάλυση με τη μέθοδο της Λουσιφεράσης	42
2.7.1 Απομόνωση RNA	43
2.7.2 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT)	44
2.7.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (PCR)	44
2.8 Ανοσοσύζωμα κατά Western	45
2.8.1 Συλλογή των κυττάρων	46
2.8.3 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης.....	48
2.8.4 Κάλυψη μη ειδικών θέσεων	48

2.8.5 Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές αντίσωμα	49
2.8.6 Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το δευτερογενές αντίσωμα	49
2.8.7 Εμφάνιση πάνω σε φιλμ	49
2.9 Διαλύματα	50
2.9.1 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR	50
2.9.2 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στο ανοσοσύτρωμα κατά Western	50
2.10 Στατιστική επεξεργασία	51
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
3.1 Το 3' UTR του Stag2 mRNA αποτελεί στόχο αρκετών microRNAs	52
3.2 Ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης	52
3.2.1 Ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης στο wild-type 3' UTR του Stag2	54
3.2.2 Ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης στο mutant 3' UTR του Stag2	55
3.3 Μελέτη της δράσης των microRNA στα ενδογενή επίπεδα του Stag2 mRNA	56
3.4 Μελέτη της δράσης των microRNA στα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης STAG2 ...	57
3.5 Μελέτη της έκφρασης των ενδογενών επιπέδων των microRNAs και του Stag2 mRNA στις διάφορες κυτταρικές σειρές	60
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
4.1 Μελλοντικές Μελέτες	65
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

Abstract

Stromal antigen 2 (STAG2) is one of the four components of the highly conserved cohesin complex which is responsible for sister chromatid segregation, chromatin structure, gene expression, and DNA repair. STAG2 is also one of the 12 most mutated genes in cancer, however, the cause of the mutations or their importance for carcinogenesis remains controversial. The purpose of this study was to explore if Stag2 is a microRNA target. To test this hypothesis, different bioinformatics programs were initially combined to identify putative evolutionary conserved microRNA sites in the 3'UTR of Stag2 mRNA. Four microRNAs, miR-21, miR-22, miR-101 and miR-124 were selected for further analysis. Luciferase Assay, RT-qPCR and Western blotting were performed in HEK293 and U2OS cells transfected with either microRNA mimics or inhibitors to evaluate the affinity of these microRNAs for Stag2 mRNA. We found that miR-21 and miR-22 were the only ones to consistently regulate the levels of Stag2 mRNA and protein. Lastly, we found an anti-correlation between Stag2 mRNA levels and that of miR-21 and miR-22 expression in 47 different cell lines.

In conclusion, miR-21 and miR-22 physiologically silence Stag2 mRNA and protein expression, while miR-101 and miR-124 do not have a regulatory role.

Περίληψη

Η πρωτεΐνη STAG2 (stromal antigen 2) είναι ένα από τα τέσσερα συστατικά του υψηλά συντηρημένου συμπλόκου των κοχεσινών το οποίο είναι υπεύθυνο για τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων, τη δομή της χρωματίνης, τη γονιδιακή έκφραση και την επιδιόρθωση του DNA. Η STAG2 είναι ένα από τα 12 πλέον μεταλλαγμένα γονίδια σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, ωστόσο, ο μηχανισμός που οδηγεί στη μετάλλαξη του γονιδίου και εάν αυτό σχετίζεται με καρκινογένεση παραμένει αμφιλεγόμενος. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να βρεθεί εάν η Stag2 ρυθμίζεται φυσιολογικά από microRNAs. Για να διαπιστωθεί αυτή η υπόθεση, αρχικά χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα βιοπληροφορικής για να προσδιοριστούν microRNAs που μπορούν να υβριδοποιηθούν σε αυτό. Βρέθηκαν 4 πιθανά microRNAs, τα miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 με υψηλή συγγένεια και συμπληρωματικά για το 3'UTR του Stag2 mRNA. Στη συνέχεια, διεξήχθησαν πειράματα λουσιφεράσης, RT-qPCR και Western blot σε HEK293 και U2OS κύτταρα που διαμολύνθηκαν με mimic και inhibitor αυτών των microRNAs. Διαπιστώθηκε ότι μόνο τα miR-21 και miR-22 μείωναν με συνέπεια τα επίπεδα του Stag2 mRNA και πρωτεΐνης. Τέλος, μελετώντας 47 διαφορετικές κυτταρικές σειρές διαπιστώθηκε ότι υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του Stag2 mRNA και αυτών των miR-21 και miR-22.

Συμπερασματικά, το miR-21 και το miR-22 συμβάλλουν στην αποσιώπηση της έκφρασης του Stag2, ενώ τα miR-101 και miR-124 δεν ρυθμίζουν την έκφραση της Stag2.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κοχεςίνες

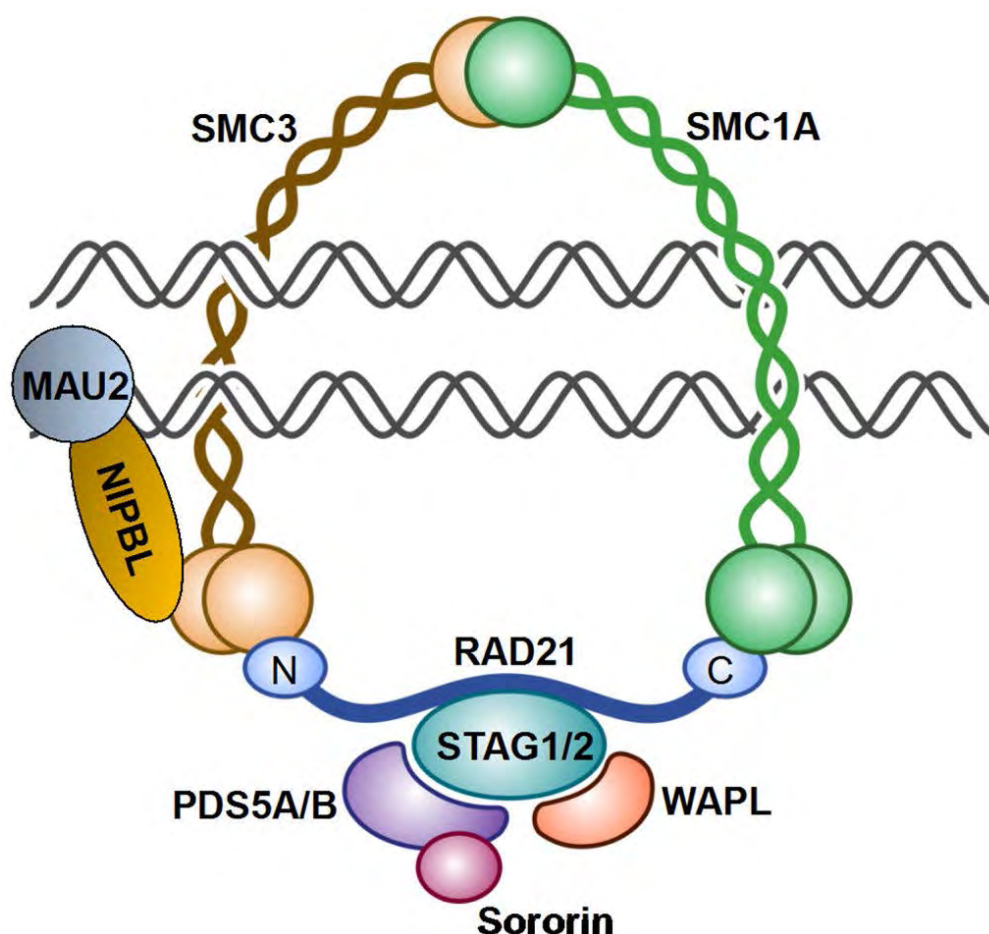
Τα κύτταρα έχουν ακριβείς μηχανισμούς για τον έλεγχο της συνοχής των αδελφών χρωματίδων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η κατάλληλη κατανομή του γενετικού υλικού στα θυγατρικά κύτταρα. Η κύρια μοριακή οντότητα σε αυτή τη διαδικασία είναι το εξαιρετικά εξελικτικά συντηρημένο σύμπλοκο των κοχεσινών. Οι κοχεςίνες είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που έχει σημαντικό ρόλο στη συνοχή των αδελφών χρωματίδων, στη δομή της χρωματίνης, στην έκφραση γονιδίων και στην επιδιόρθωση του DNA. Οι κοχεςίνες αναγνωρίστηκαν αρχικά σε ζυμομύκητες λόγω μεταλλάξεων που

εμφάνιζαν πρόωρο διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων και σύντομα στη συνέχεια βρέθηκαν να σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα που απαιτείται για την συνοχή των αδελφών χρωματίδων στα εκχυλίσματα αυγού *Xenopus* και στα κύτταρα θηλαστικών [1], [2]. Στους ανθρώπους, οι κοχεσίνες είναι ένα πανταχού παρών πρωτεϊνικό σύμπλοκο, πολλαπλών υπομονάδων που αποτελείται από τις κύριες υπομονάδες SMC1A, SMC3, RAD21, STAG1 / 2 και από τις ρυθμιστικές υπομονάδες των WAPL, PDS5A / B, CDCA5, NIPBL και MAU2. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες των κοχεσινών αλλά και ρυθμιστικές πρωτεΐνες αυτών μεταλλάσσονται σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκίνων [3]–[6] και σε σύνδρομα αναπτυξιακών διαταραχών. [7]–[9].

1.1.1 Δομή Κοχεσινών

Στα σωματικά κύτταρα σπονδυλωτών, το σύμπλεγμα των κοχεσινών αποτελείται από τέσσερις βασικές πρωτεϊνικές υπομονάδες, τις SMC1A (structural maintenance of chromosomes protein 1A), SMC3 (structural maintenance of chromosomes protein 3), RAD21 (double-strand-break protein rad21 homolog) και είτε STAG1 ή STAG2 (cohesion subunit SA1 / 2). Αρκετές επιπρόσθετες πρωτεΐνες χρησιμεύουν κυρίως για τη ρύθμιση του κύριου συμπλέγματος των κοχεσινών, συμπεριλαμβανομένης της NIPBL (Nipped-B-like protein) και της MAU2 (MAU2 chromatid cohesion factor homolog) οι οποίες απαιτούνται για τη φόρτωση των κοχεσινών στη χρωματίνη. Οι WAPL (wings apart-like protein homolog), PDS5A και PDS5B (sister chromatid cohesion protein PDS homolog A and B) απαιτούνται για την εκφόρτωση των κοχεσινών από τη χρωματίνη ενώ η CDCA5 (sororin) εμπλέκεται στην ίδρυση της σύνδεσης των αδελφών χρωματίδων μεταξύ τους. Οι κύριες υπομονάδες των κοχεσινών πιστεύεται ότι σχηματίζουν μια δομή που μοιάζει με δακτύλιο που περικυκλώνει την χρωματίνη για να ενώσει τις αδελφές χρωματίδες και να φέρει μαζί διαφορετικά αποκλίνοντες περιοχές της χρωματίνης. Το πιο ευρέως αποδεκτό τρέχον μοντέλο απεικονίζεται στην Εικόνα 1. Εν συντομία, οι υπομονάδες SMC1A και SMC3 διμερίζονται μέσω των τομέων αρθρώσεών τους, σχηματίζοντας ένα σχήμα V που συνδέεται στο κάτω μέρος με τη λεγόμενη "υπομονάδα kleisin" RAD21 για τον σχηματισμό ενός τριμερούς δακτυλίου. Στη

συνέχεια, η RAD21 δεσμεύει μια υπομονάδα αλληλεπίδρασης kleisin και είτε STAG1 είτε STAG2. Οι ρυθμιστικοί παράγοντες δεσμεύονται στη συνέχεια στο σύμπλεγμα όπως και όταν απαιτείται [10]–[12].

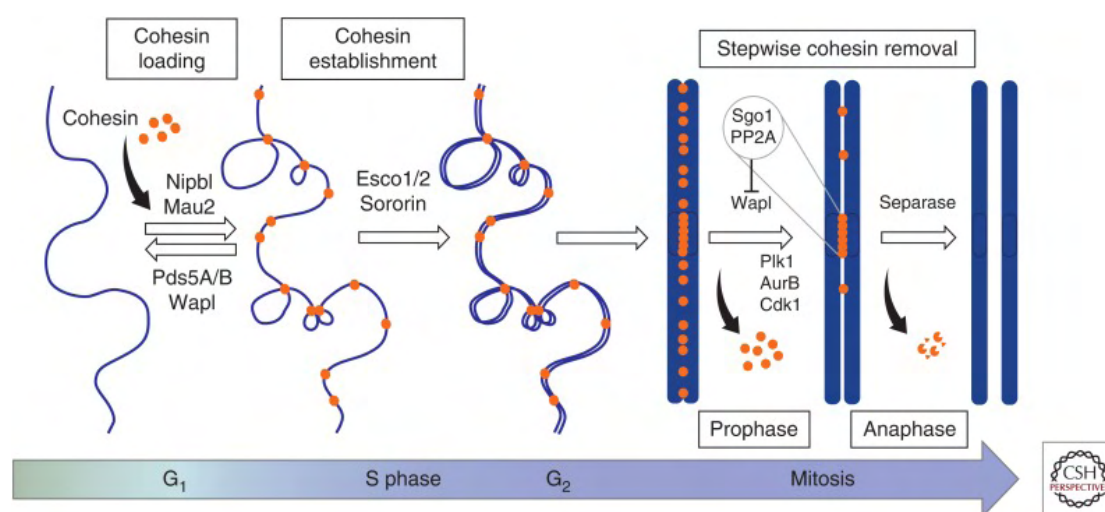


Εικόνα 1. Μοντέλο των κοχσινών [6].

1.1.2 Φόρτωση και Εκφόρτωση των Κοχσινών στη Χρωματίνη

Για να επιτευχθεί αποτελεσματική συνοχή και ακριβής διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων στα θυγατρικά κύτταρα, η συνεκτικότητα στη φόρτωση και εκφόρτωση των κοχσινών στο DNA ρυθμίζεται στενά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 2). Η φόρτωση και η εκφόρτωση των κοχσινών συμβαίνει ως μια δυναμική διαδικασία που αρχίζει στα αρχικά στάδια της G1 φάσης. Η φόρτωση απαιτεί το ετεροδιμερές NIPBL / MAU2 να δεσμεύεται στις κύριες πρωτεϊνικές υπομονάδες των κοχσινών, διεγείροντας τη δραστικότητα της ΑΤΡάσης του SMC1A / SMC3. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον παροδικό διαχωρισμό της περιοχής άρθρωσης, επιτρέποντας στο σύμπλεγμα να περικλείει την χρωματίνη [13]. Η εκφόρτωση των κοχσινών από τη χρωματίνη σε αυτό το στάδιο εξαρτάται από τη σύνδεση των

WAPL και PDS5A/B [14]. Προκειμένου να επιτευχθεί συνοχή κατά την αντιγραφή του DNA, σταθεροποιείται το συνδεδεμένο με χρωματίνη κλάσμα των κοχεσινών. Η σταθεροποίηση απαιτεί τόσο την μετα-μεταφραστική τροποποίηση του SMC3 από τις ακετυλοτρανσφεράσες των κοχεσινών, ESCO1 και ESCO2, όσο και την μετατόπιση του WAPL με τη δέσμευση του CDCA5 στο PDS5A/B, η οποία εμποδίζει την εκφόρτωση εξαρτώμενη από το WAPL και την PDS5A/B [14], [15]. Μόλις τα κύτταρα εισέλθουν στη μίτωση, το σύμπλεγμα των κοχεσινών απομακρύνεται από τους βραχίονες των χρωμοσωμάτων μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των CDCA5 και STAG1/2, οι οποίες προάγουν την απομάκρυνση του CDCA5, επιτρέποντας την εξαρτώμενη από WAPL εκφόρτωση. Ένα μικρό ποσοστό των κοχεσινών προστατεύεται κατά τη διαδικασία αυτή από την SGO1 (Shugosin) και παραμένει στο κεντρομερές [16]–[19]. Κατά την έναρξη της αναφάσης, η κεντρομερική συνοχή εξασθενεί μέσω της διάσπασης του RAD21 από τη διαχωριστική πρωτεάση κυστεΐνης, επιτρέποντας το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων στα δύο νέα κύτταρα [20]–[22].



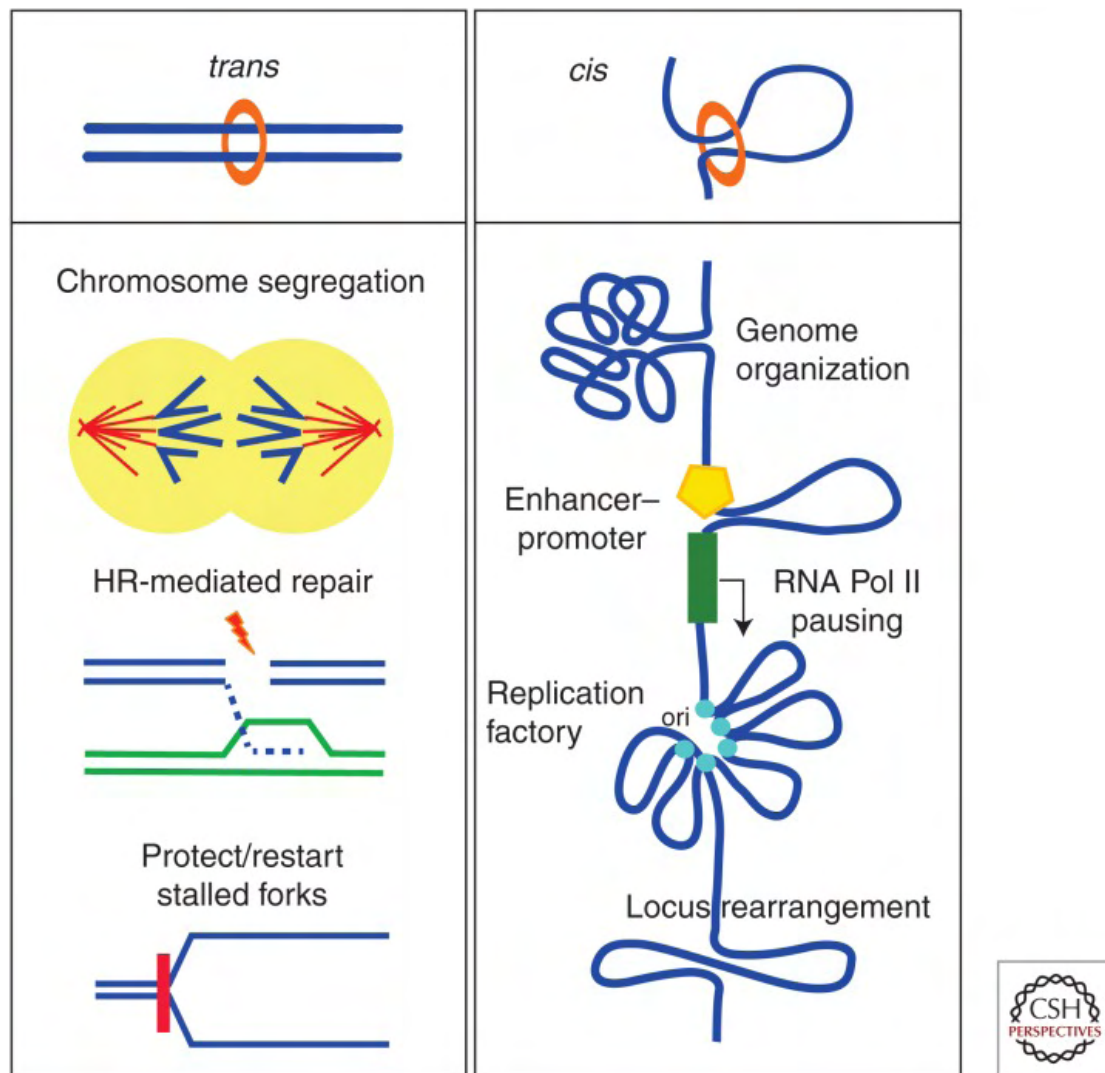
Εικόνα 2. Οι κοχεσίνες και οι ρυθμιστές τους κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Οι κοχεσίνες φορτώνονται στη χρωματίνη από τις Nipbl-Mau2 καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ξεκινώντας από την πρώιμη G1. Οι Pds5 και Wapl συσχετίζονται με τις χρωματίδες που δεσμεύονται με τις κοχεσίνες και προάγουν την εκφόρτωσή της. Τα σύμπλοκα της κοχεσίνης μπορεί να περικυκλώνουν μία απλή ίνα χρωματίνης ή δύο ίνες στη βάση ενός βρόχου χρωματίνης που φέρνει πιο κοντά απομακρυσμένες περιοχές του DNA. Κατά τη διάρκεια της φάσης S, η ακετυλίωση του Smc3 από την Escalator/2 CoATs και η στρατολόγηση της πρωτεΐνης Sororin, που διευκολύνεται από το Pds5A/B (δεν απεικονίζεται), έχει ως αποτέλεσμα την

εγκαθίδρυση της συνοχής. Ένα κλάσμα των κοχρεσινών παραμένει ενεργό ακόμη και μετά την αντιγραφή του DNA (δεν απεικονίζεται). Στην πρόφαση, το μεγαλύτερο μέρος των κοχρεσινών απομακρύνεται από τη χρωματίνη σε μια διαδικασία που απαιτεί την Wapl και τη φωσφορυλίωση των κοχρεσινών και της Sororin. Η Sgo1 και η φωσφατάση PP2A εμποδίζουν τη διάσπαση ενός μεγάλου μέρους των κοχρεσινών, κυρίως στα κεντρομερή. Αυτός ο πληθυσμός απομακρύνεται στην αρχή της ανάφασης όταν καταστρέφεται η Securin (που δεν απεικονίζεται) και η ενεργός Separase αποκόπτει την Rad21 [23].

1.1.3 Λειτουργία Κοχρεσινών

Ο δακτύλιος των κοχρεσινών έχει πολλές λειτουργίες:

1. Χρησιμοποιείται για τη διατήρηση των αδελφών χρωματίδων συνδεδεμένες μεταξύ τους κατά τη διάρκεια της μετάφασης, εξασφαλίζοντας ότι κατά τη διάρκεια της μίτωσης (και της μείωσης), κάθε αδελφή χρωματίδα διαχωρίζεται σε αντίθετους πόλους. Χωρίς τις κοχρεσίνες, το κύτταρο θα ήταν ανίκανο να ελέγξει τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων, δεδομένου ότι δεν θα υπήρχε κανένας τρόπος να διασφαλιστεί εάν οι άξονες της ατράκτου που συνδέεται σε κάθε αδελφή χρωματίδα προέρχεται από διαφορετικό πόλο [24]–[29].
2. Διευκολύνει την προσάρτηση της ατράκτου στα χρωμοσώματα [30].
3. Διευκολύνει την επιδιόρθωση του DNA με την μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού [31]–[35].
4. Πρόσφατα έχουν ανακαλυφθεί πολλές νέες λειτουργίες του συμπλέγματος των κοχρεσινών σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες. Έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της μεταγραφής, την επισκευή της δίκλωνης ρήξης του DNA, τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, τη σύζευξη ομόλογων χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης I, τον μονο-προσανατολισμό του κινετοχώρου των αδελφών χρωματίδων κατά τη διάρκεια της μείωσης I, τη μη ομόλογη σύζευξη κεντρομερούς, την αρχιτεκτονική και την αναδιάταξη του χρωμοσώματος και για το διπλασιασμό του γενετικού υλικού [36] (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Λειτουργίες των κοχεσινών. Οι κοχεσίνες παίζουν σημαντικούς ρόλους σε αρκετές κυτταρικές διεργασίες που περιλαμβάνουν το DNA. Αυτοί οι ρόλοι βασίζονται στην ικανότητα των κοχεσινών να συγκρατούν τους δύο κλώνους του DNA σε *trans* (τις δύο αδελφές χρωματίδες) ή σε *cis* (π.χ., στη βάση ενός βρόχου χρωματίνης). Ο ακριβής διαχωρισμός χρωμοσωμάτων στη μίτωση και τη μείωση, η επιδιόρθωση του DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό και η επανεκκίνηση ή / και η προστασία της σταματημένης θηλιάς αντιγραφής χρειάζονται την συνοχή των αδελφών χρωματίδων (αριστερά). Ο βρόχος που δημιουργείται από τις κοχεσίνες σε συνεργασία με τον μεταγραφικό παράγοντα CTCF, ή άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, μεταξύ άλλων, πιθανόν παρέχει μια σημαντική οργανωτική αρχή για το γονιδίωμα (δεξιά). Αυτή η οργάνωση ρυθμίζει τη μεταγραφή τόσο σε ολόκληρο το γονιδίωμα, μέσω της δημιουργίας ενεργών / σιωπηλών περιοχών, και τοπικά, διευκολύνοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενισχυτή και υποκινητών που απαιτούνται για την έκφραση γονιδίου ή για την απελευθέρωση παύσης της RNA Pol II. Διευκολύνει επίσης την πυροδότηση συντονισμένης προέλευσης στα εργοστάσια υψηλής έκφρασης και ανασυνδυασμού σε γενετικούς τόπους όπως IgH ή TCRα. Για λόγους απλούστευσης, απεικονίζεται ένας απλός δακτύλιος κοχεσίνης που περικλείει τις δύο ίνες DNA, αλλά είναι δυνατές εναλλακτικές διαμορφώσεις [23], [37].

1.1.4 Μηχανισμός Δράσης των Κοχυσινών

Ο μηχανισμός δράσης των κοχυσινών δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Υπάρχουν δύο πιθανά σενάρια:

1. Οι υπομονάδες των κοχυσινών συνδέονται με κάθε αδελφή χρωματίδα και σχηματίζουν μια γέφυρα μεταξύ των δύο.
2. Δεδομένου ότι οι κοχυσίνες σχηματίζουν μια δομή δακτυλίου, είναι σε θέση να περικυκλώνουν μαζί τις αδελφές χρωματίδες (handcuff model).

Τα τρέχοντα στοιχεία δείχνουν ότι το δεύτερο σενάριο είναι το πιο πιθανό. Οι πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη συνοχή των αδελφών χρωματίδων, όπως οι Smc3 και Scc1, δεν ρυθμίζουν τον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των κοχυσινών και του DNA, υποδεικνύοντας ότι η αλληλεπίδραση του DNA δεν επαρκεί για τη συνοχή [38]. Επιπροσθέτως, η διαταραχή της δομής δακτυλίου των κοχυσινών μέσω της διάσπασης των Smc3 ή Scc1 προκαλεί πρόωρο διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων *in vivo* [39]. Αυτό δείχνει ότι η δομή του δακτυλίου είναι σημαντική για τη λειτουργία των κοχυσινών. Παρόλο που η υπόθεση του δακτυλίου φαίνεται να είναι έγκυρη, εξακολουθούν να υπάρχουν ερωτήσεις σχετικά με τον αριθμό των δακτυλίων που απαιτούνται για να διατηρηθούν μαζί οι αδελφές χρωματίδες. Μια πιθανότητα είναι ότι ένας δακτύλιος περιβάλλει τις δύο χρωματίδες. Μια άλλη πιθανότητα είναι η δημιουργία ενός διμερούς όπου κάθε δακτύλιος να περιβάλλει μια αδελφή χρωματίδα. Οι δύο δακτύλιοι συνδέονται μεταξύ τους μέσω του σχηματισμού μιας γέφυρας που συγκρατεί μαζί τις δύο αδελφές χρωματίδες. Η σύνδεση των δύο αδελφών χρωματίδων μαζί από τις κοχυσίνες εγκαθιδρύεται στη φάση S κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής του DNA για να κρατήσει τις αδελφές χρωματίδες κοντά για να γίνει ο ανασυνδυασμός και η επιδιόρθωση [31]. Τα σύμπλοκα συνδέονται με τα χρωμοσώματα πριν από τον διπλασιασμό του DNA. Όταν τα κύτταρα αρχίσουν να αναπαράγουν το DNA τους, οι δακτύλιοι των κοχυσινών κλείνουν και συνδέουν τις αδελφές χρωματίδες μαζί [38]. Τα συμπλέγματα της κοχυσίνης πρέπει να είναι παρόντα κατά τη φάση S για να επιτευχθεί η συνοχή. Οι κοχυσίνες πρέπει να συνδέουν τα χρωμοσώματα πριν από την έναρξη της αντιγραφής του DNA ώστε να είναι σε θέση να δημιουργήσουν

λειτουργικούς δεσμούς. Η φόρτωση των κοχυσινών στο DNA εξαρτάται από το σύμπλεγμα φορτωτή των κοχυσινών Scc2-Scc4 [20], [40].

1.1.5 Τα Παράλογα Γονίδια STAG1, STAG2, STAG3

Κάθε πρωτεϊνικό σύμπλοκο κοχυσινών αποτελείται από τις SMC1A, SMC3, RAD21 και ένα από τα τρία παράλογα γονίδια, είτε STAG1 ή STAG2 ή STAG3 αλλά όχι δύο από αυτά [41], [42]. Η STAG1 έχει δειχθεί ότι είναι μέρος του πρωτεϊνικού συμπλόκου των κοχυσινών που συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες στους βραχίονες και στα τελομερή των χρωμοσωμάτων, ενώ η STAG2 υπομονάδα εντοπίζεται στα σύμπλοκα των κοχυσινών που συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες στα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων [43]. Επίσης, η STAG2 υπερέχει στην ποσότητα ενάντια της STAG1 στα σωματικά κύτταρα, καθώς βρέθηκε ότι υπάρχει αναλογία 12-15 μόρια STAG2 προς 1 STAG1, στα κύτταρα HeLa [44]. Τέλος, η STAG3 μαζί με τις SMC1β, SMC3 και REC8 φαίνεται να συμμετέχουν στην συνοχή των αδελφών χρωματίδων καθ' όλη τη μειωτική διαδικασία στα ανθρώπινα ωοκύτταρα. Οι πρωτεΐνες SMC1β, REC8 και STAG3 είναι ειδικές κοχυσίνες για τη διαδικασία της μείωσης [45]. Η πρωτεΐνη STAG3 φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη μείωση των θηλυκών ατόμων. Μια ομοζυγωτική μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης στο γονίδιο *Stag3* ταυτοποιήθηκε σε μια μεγάλη συγγενή οικογένεια με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια [46]. Επίσης, τα θηλυκά ποντίκια που δεν έχουν λειτουργικό γονίδιο *Stag3* είναι στείρα και τα εμβρυϊκά ωοκύτταρά τους σταματούν στην πρόωμη πρόφαση 1.

1.2 Η Κοχυσίνη STAG2

Το γονίδιο *Stag2* ή αλλιώς stromal antigen 2 βρίσκεται στον μακρύ άξονα του Χ χρωμοσώματος και πιο συγκεκριμένα στην χρωμοσωμική θέση Xq25 από το ζεύγος βάσεων 123,094,475 μέχρι και το ζεύγος βάσεων 123,236,505 (GRCh38/hg38 assembly). Το γονίδιο αυτό έχει μήκος 142,031 ζεύγη βάσεων και κωδικοποιεί πρωτεΐνη με μέγεθος 1,231 αμινοξέα και μοριακή μάζα 141 kDa. Ανακαλύφθηκε το

1997 με την διαλογή μίας βιβλιοθήκης cDNA ανθρώπινου θύμου αδένος με ένα cDNA SA1 ποντικού, απομονώθηκε ένα cDNA που κωδικοποιεί το STAG2, το οποίο ονόμασαν SA2. Η τελική πρωτεΐνη βρέθηκε ότι είχε 1,162 αμινοξέα και η αλληλουχία της είναι 78% παρόμοια με εκείνη του STAG1. [47]. Με ανοσοκατακρήμνιση και αναλύσεις ανοσοστυπώματος κατά Western, δείχθηκε ότι το προϊόν του γονιδίου του STAG2 εκφράζεται ως πρωτεΐνη περίπου 140kD που συναρμολογείται με τις πρωτεΐνες των κοχσινών SMC1, SMC3 και SCC1 (RAD21). Το σύμπλοκο των κοχσινών συν-κατακρημνίζεται επίσης με την PDS5, αλλά με έναν λιγότερο σταθερό τρόπο από ότι οι πρωτεΐνες στο συγκρότημα των κοχσινών. Η μικροσκοπία ανοσοφθορισμού κατέδειξε μη πυρηνική έκφραση του STAG2 κατά το στάδιο της μεσόφασης και της πρώιμης πρόφασης, αλλά δεν υπήρχε έκφραση του STAG2 ξανά μέχρι την τελοφάση, με την έναρξη της αποσυμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων. Ο τρόπος έκφρασης του STAG2 είναι παρόμοιος με εκείνον των STAG1, PDS5 και των άλλων υπομονάδων των κοχσινών. Η αποδιάταξη των κοχσινών βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη από το σύμπλοκο προαγωγής της ανάφασης (APC) [42]. Προτάθηκε ότι υπάρχει ένα σηματοδοτικό μονοπάτι κατά το στάδιο της πρόφασης που απομακρύνει το μεγαλύτερο μέρος των συμπλόκων των κοχσινών, επιτρέποντας έτσι τη συμπύκνωση χρωμοσωμάτων ενώ απελευθερώνει τη συνοχή μεταξύ των βραχιόνων των χρωμοσωμάτων και ότι η υπολειμματικές κοχσίνες απομακρύνονται μέσω ενός μονοπατιού κατά το στάδιο της αναφάσης [42]. Η STAG2 φωσφορυλιώνεται από την PLK1 κατά τη διάρκεια της πρόφασης και πιθανότατα έτσι τα περισσότερα σύμπλοκα της κοχσίνης διαχωρίζονται από τη χρωματίνη εκτός από τα κεντρομερικά σύμπλοκα, όπου παραμένει ένα ποσοστό των αρχικών συμπλόκων κοχσίνης [48], [49].

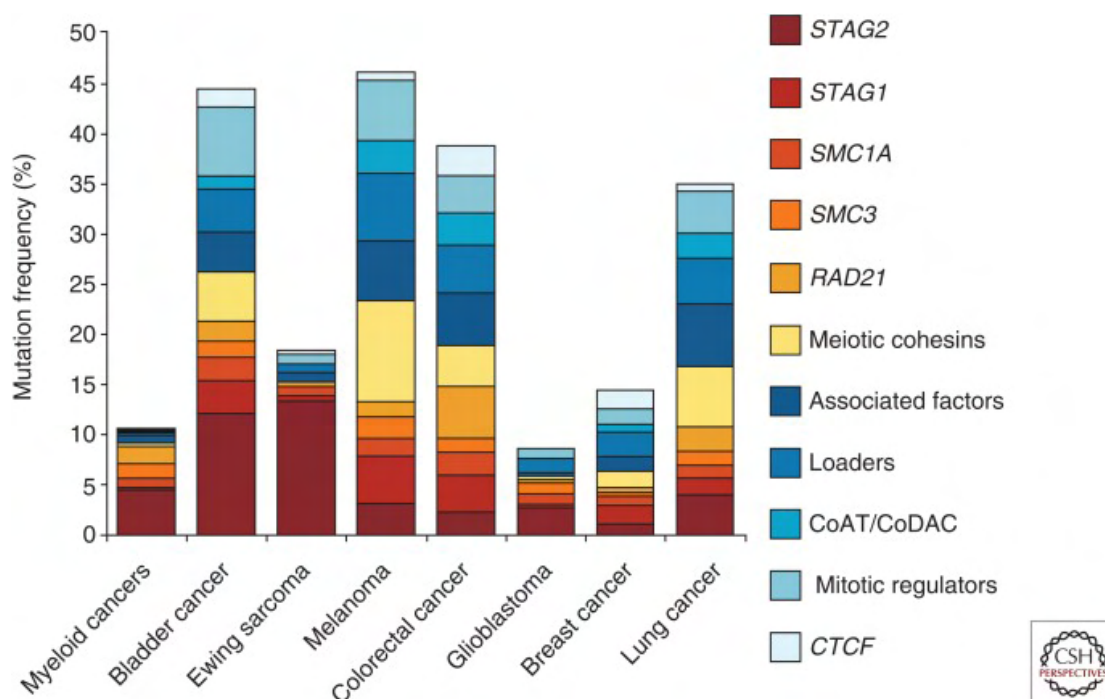
1.2.1 Ο Ρόλος της STAG2 στον Καρκίνο.

Πρόσφατες παν-καρκινικές μελέτες τοποθέτησαν το σύμπλεγμα των κοχσινών και των ρυθμιστών του ανάμεσα στα πρωτεϊνικά δίκτυα που είναι πιο συχνά μεταλλαγμένα στον καρκίνο [3]–[5] (Εικόνα 4). Η ελαττωματική ικανότητα των κυττάρων να επιτελέσουν σωστά τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και η

ανευπλοειδία, δηλαδή μια απόκλιση από τον αναμενόμενο διπλοειδές αριθμό των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων, αποτελούν σημεία αναφοράς για τον καρκίνο, που αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά από τον Theodor Boveri πριν από περισσότερα από εκατό χρόνια, ωστόσο τα γενετικά στοιχεία της ανευπλοειδίας παραμένουν ασαφή [49],[50]. Δεδομένου της λειτουργίας της στον έλεγχο του σωστού διαχωρισμού των αδελφών χρωματίδων, η δυσλειτουργία του συμπλέγματος της κοχεσίνης υποτίθεται ότι συμβάλλει στην ανάπτυξη της ανευπλοειδίας κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης μετά από την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό της στα τέλη της δεκαετίας του 1990. Η πρώτη αναφορά μετάλλαξης γονιδίων των κοχεσινών σε όγκους ανθρώπων ήταν το 2008 από τους Barber TD et al. όπου βρέθηκαν σωματικές μεταλλάξεις των SMC1A, SMC3 και NIPBL σε 9 από τα 132 αδеноκαρκινώματα του ορθού. Στη μελέτη αυτή πρότειναν ότι τα προβλήματα στη συνοχή των αδελφών χρωματίδων μπορεί να είναι υπεύθυνα για τη χρωμοσωμική αστάθεια που υπάρχει στη συντριπτική πλειονότητα των καρκίνων του παχέος εντέρου [27].

Οι μεταλλάξεις του *Stag2* είναι ιδιαίτερα συχνές στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (παρόν σε 30-40% των συνηθέστερων μη μυϊκών επεμβατικών όγκων), το σάρκωμα Ewing (που υπάρχει στο ~ 25% των όγκων) και τη μυελογενής λευχαιμία (παρόν σε ~ 8% των όγκων) , και υπάρχουν επίσης στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM), μελάνωμα και άλλους τύπους όγκων [28], [52]–[61]. Επισημαίνοντας τη σημασία του *Stag2* ως σημαντικού γονιδίου στον καρκίνο, το 2014, The Cancer Genome Atlas εντόπισε το *Stag2* ως ένα από τα 12 μόνο γονίδια που μεταλλάσσονται σημαντικά σε τέσσερις ή περισσότερους τύπους καρκίνου του ανθρώπου. Το γονίδιο *Stag2* βρίσκεται στο χρωμόσωμα X και ως εκ τούτου χρειάζεται μόνο ένα μεταλλακτικό συμβάν για την απενεργοποίησή του και τώρα αναγνωρίζεται ως η πλέον πιο συχνά μεταλλαγμένη από τις υπομονάδες των κοχεσινών και ως ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο [6], [62]. Επίσης, σε μια εκτεταμένη ομάδα 299 ασθενών με κλινικά δεδομένα, δείχθηκε ότι οι μεταλλάξεις του *Stag2* και του TP53 συχνά συνυπάρχουν και συνδέονται με κακή έκβαση των ασθενών [61]. Τέλος, σε έναν όγκο και τρεις κυτταρικές σειρές που προέρχονταν από σάρκωμα του Ewing, η απώλεια έκφρασης του STAG2 ανιχνεύθηκε χωρίς να έχει γίνει κάποια

σωματική μετάλλαξη, υποδηλώνοντας έτσι έναν άλλο μηχανισμό αποσιώπησης του STAG2 [53].



Εικόνα 4. Μεταλλάξεις στο σύμπλοκο των κοχεσινών και στα συναφή γονίδια στον καρκίνο. Γραμμή ράβδου που δείχνει μεταλλάξεις στους υποδεικνυόμενους τύπους καρκίνου για τις υπομονάδες της κοχεσίνης και τα συναφή με τη κοχεσίνη γονίδια [63]–[65].

1.2.2 Ο Ρόλος της STAG2 στην Ανευπλοειδία

Στην αρχική τους μελέτη που αναγνώρισε *Stag2* μεταλλάξεις στον καρκίνο, οι Solomon et al. πρότειναν ότι οι μεταλλάξεις προκάλεσαν χρωμοσωμική αστάθεια και ανευπλοειδία [52]. Αυτό το συμπέρασμα βασίστηκε στις παρατηρήσεις ότι (i) η στοχευμένη διόρθωση του ενδογενούς μεταλλαγμένου *Stag2* σε ανευπλοειδή ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα οδήγησε σε μείωση του αριθμού και της μεταβλητότητας των αριθμών χρωμοσωμάτων και (ii) εισαγωγή μιας μη ογκογονικής εκμηδενιστικής μετάλλαξης του *Stag2* σε μια γενετικά σταθερή, σχεδόν διπλοειδής κυτταρική σειρά είχε ως αποτέλεσμα μεταβολές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Αυτά τα ευρήματα ήταν συνεπή με άλλες παρατηρήσεις σε

ζυμομύκητες, ποντίκια και άλλα συστήματα μοντέλων που δείχνουν ότι μεταλλάξεις σε υπομονάδες κοχσινών οδηγούν σε λανθασμένο χρωμοσωμικό διαχωρισμό και ανευπλοειδία [29], [66]–[68]. Ωστόσο, από την αρχική αυτή δημοσίευση, άλλες μελέτες δείχνουν ότι δεν υπάρχει η ότι μπορεί να υπάρχει σε μικρό βαθμό συσχέτιση μεταξύ της μεταλλαγμένης STAG2 και της ανευπλοειδίας σε ανθρώπινους όγκους και έχουν επιπλέον δείξει ότι πολλοί μεταλλαγμένοι όγκοι STAG2 έχουν τον σωστό αριθμό χρωμοσωμάτων και δεν παρουσιάζουν ανευπλοειδίες [55], [57]. Σε μια προσπάθεια αντιμετώπισης αυτών των αποκλίσεων, χρησιμοποιήθηκε γονιδιακή στόχευση ανθρώπινου σωματικού κυττάρου για να εισαγάγει εννέα διαφορετικές μεταλλάξεις στο *Stag2* γονίδιο όπου είχαν παρατηρηθεί σε άλλα καρκινικά κύτταρα, στα HCT116 κύτταρα, μια σχεδόν διπλοειδής ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκινώματος με γονίδια των κοχσινών αγρίου τύπου και άθικτη συνοχή των αδελφών χρωματίδων. Στη συνέχεια μέτρησαν τη συνοχή των αδελφών χρωματίδων, την ακεραιότητα της ανάφασης και τον αριθμό των χρωμοσωμάτων σε αυτά τα νέα κύτταρα που έφεραν τις μεταλλάξεις. Όλες οι μεταλλάξεις που τερμάτιζαν πρώιμα την λειτουργική STAG2 πρωτεΐνη, είχαν ως αποτέλεσμα σημαντικά ελαττώματα στην ακεραιότητα της συνοχής των αδελφών χρωματίδων, ενώ οι μεταλλάξεις που άλλαζαν ένα αμινοξύ της πρωτεΐνης είχαν τον ίδιο φαινότυπο με του αγρίου τύπου κύτταρα. Επιπλέον, η ακεραιότητα της αναφάσεως διακόπηκε σε μόνο 3/9 κυτταρικές σειρές. Τέλος, μόνο μία από τις εννέα κυτταρικές γραμμές εμφάνισε μεταβολές στον αριθμό χρωμοσωμάτων. Αυτά τα αποτελέσματα έθεσαν τελικά την ερώτηση για το εάν οι σχετικοί με τον καρκίνο φαινότυποι των μεταλλάξεων του *Stag2* σχετίζονται άμεσα με την συνοχή των αδελφών χρωματίδων και την ανευπλοειδία [69].

1.2.3 Ο Ρόλος της STAG2 στη Γονιδιακή Ρύθμιση

Ο μεταγραφικός καταστολέας CTCF επίσης γνωστός ως παράγοντας δέσμευσης CCCTC είναι ένας παράγοντας μεταγραφής ο οποίος στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο *CTCF* [70], [71]. Ο CTCF εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφικής ρύθμισης, της δραστηριότητας του μονωτή, του V(D)J ανασυνδυασμού στα B και T λεμφοκύτταρα και στη ρύθμιση της

αρχιτεκτονικής της χρωματίνης, ιδιαίτερα σε σχέση με το σχηματισμό δομών φουρκέτας της χρωματίνης σημαντικές για τις ενδο- και τις δια-χρωμοσωματικές επαφές [72]–[74]. Ο CCCTC-δεσμευτικός παράγοντας ή CTCF αρχικά ανακαλύφθηκε ως αρνητικός ρυθμιστής του γονιδίου *c-myc* στο κοτόπουλο. Αυτή η πρωτεΐνη βρέθηκε να είναι προσδεσμένη σε τρεις κανονικά απέχουσες επαναλήψεις της αλληλουχίας πυρήνα CCCTC και έτσι ονομάστηκε παράγοντας δέσμευσης CCCTC [75]. Εκτός από τις μεταλλάξεις των ίδιων των κοχυσινών, οι μεταλλάξεις των θέσεων δέσμευσης των κοχυσινών και του CTCF βρίσκονται συνήθως σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους [76]. Οι κοχυσίνες μαζί με τον CTCF έχει προταθεί ότι ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων ταυτότητας των κυττάρων [77], ή με ιστό-ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες [78] μέσω του ελέγχου της δομής του χρωμοσώματος. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έδειξαν ότι οι κοχυσίνες συνδέονται με τον παράγοντα δέσμευσης CTCF [79], [80]. Αυτή η σύνδεση των κοχυσινών με τον CTCF οφείλεται στην άμεση σύνδεση μεταξύ των STAG2 και CTCF, όπου το CTCF είναι περιττό για την φόρτωση των κοχυσινών στη χρωματίνη, αλλά απαιτείται για την πρόσδεση των κοχυσινών σε ρυθμιστικούς τόπους ειδικού ενισχυτή σε όλο το γονιδίωμα [81]. Επιπροσθέτως οι κοχυσίνες συσσωρεύονται σε θέσεις δέσμευσης του CTCF κατά μήκος των γονιδιωμάτων ανθρώπου και ποντικού, αλλά μόνο όταν υπάρχει ο CTCF [71], [79], [80], [82]. Δεδομένα αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος από περισσότερα από 200 δείγματα ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο (CRC) μαζί με αναλύσεις ChIP-seq σε μια κυτταρική σειρά CRC αποκάλυψαν υψηλή εμφάνιση μεταλλάξεων σε θέσεις δέσμευσης των κοχυσινών με τον CTCF στο γονιδίωμα κυρίως σε περιοχές που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες [76]. Ένα κλάσμα αυτών των μεταλλάξεων προβλέπεται να επηρεάζει τη συνάφεια σύνδεσης CTCF με *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία και συνεπώς θα μπορούσε να συνεισφέρει στην ογκογένεση μέσω της παρεκκλίνουσας έκφρασης των γονιδίων στόχων τους. Ένας άλλος επιγενετικός μηχανισμός που περιγράφηκε πρόσφατα σε γλοιώματα ενέχει την αποδιοργάνωση ρυθμιστικών στοιχείων μέσω υπερμεθυλίωσης των θέσεων δέσμευσης CTCF και των κοχυσινών που οδηγούν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων [83]. Τέλος, σε μία από τις μελέτες που περιγράφηκαν σε κύτταρα μυελού των οστών που υποβλήθηκαν σε αγωγή με shRNAs έναντι του *Stag2* εμφάνισαν σημαντικές αλλοιώσεις στην έκφραση γονιδίων. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να

οφείλεται στην διατάραξη της σύνδεσης των κοχρεσινών με τον παράγοντα CTCF στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος, λόγω της αποσιώπησης του STAG2. Επιπλέον, αυτές οι μεταβολές ήταν παρόμοιες με εκείνες που παρατηρήθηκαν σε knockdown του Smc1α, υποδηλώνοντας ότι η μεταγραφική ρύθμιση που μεσολαβείται από τις κοχρεσίνες στα HPSCs εξαρτάται συγκεκριμένα από την STAG2 κοχρεσίνη [84].

1.3 microRNAs

Τα microRNA (ή αλλιώς miRNA) είναι μικρά μονόκλωνα μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (που περιέχουν περίπου 22 νουκλεοτίδια) που βρίσκονται σε φυτά, ζώα και ορισμένους ιούς, και λειτουργούν στη σίγηση RNA και τη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [85]–[87]. Έχει προβλεφθεί ότι τα miRNA αντιπροσωπεύουν το 1-5% του ανθρώπινου γονιδιώματος και ρυθμίζουν τουλάχιστον το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες [88]–[92]. Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί 940 διαφορετικά μόρια miRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα [93]–[96]. Τα miRNA υβριδοποιούνται με συμπληρωματικές αλληλουχίες στις 3'-αμετάφραστες περιοχές (3'UTRs) στο mRNA [97], και οδηγούν στην σίγηση των γονιδίων μέσω της αποσταθεροποίησης του mRNA ή αποτροπής της μετάφρασης του [98], [99]. Αντίθετα, οι θέσεις πρόσδεσης του miRNA σε ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης και 5'-UTRs συμβάλλουν ελάχιστα στη γονιδιακή σίγηση [100], [101]. Η αλληλουχία συμπληρωματικότητας στην “seed region” (νουκλεοτίδια 2-8) σε miRNAs έχει ιδιαίτερη σημασία για τη σύνδεση με τα mRNA στόχους.

Η εξαρτώμενη από miRNA αποικοδόμηση του mRNA λαμβάνει χώρα στο σύμπλεγμα RISC (RNA induced silencing complex) μέσω της δέσμησης του miRNA σε πρωτεΐνες Argonaute [102]. Η ρύθμιση γονιδίων από τα miRNAs είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο γεγονότων. Τα miRNAs μπορούν να δεσμευτούν σε πολλαπλά και ακόμη χιλιάδες γονίδια στόχους και τα γονίδια μπορούν να ρυθμιστούν με πολλαπλά miRNAs [86], [103]–[105].

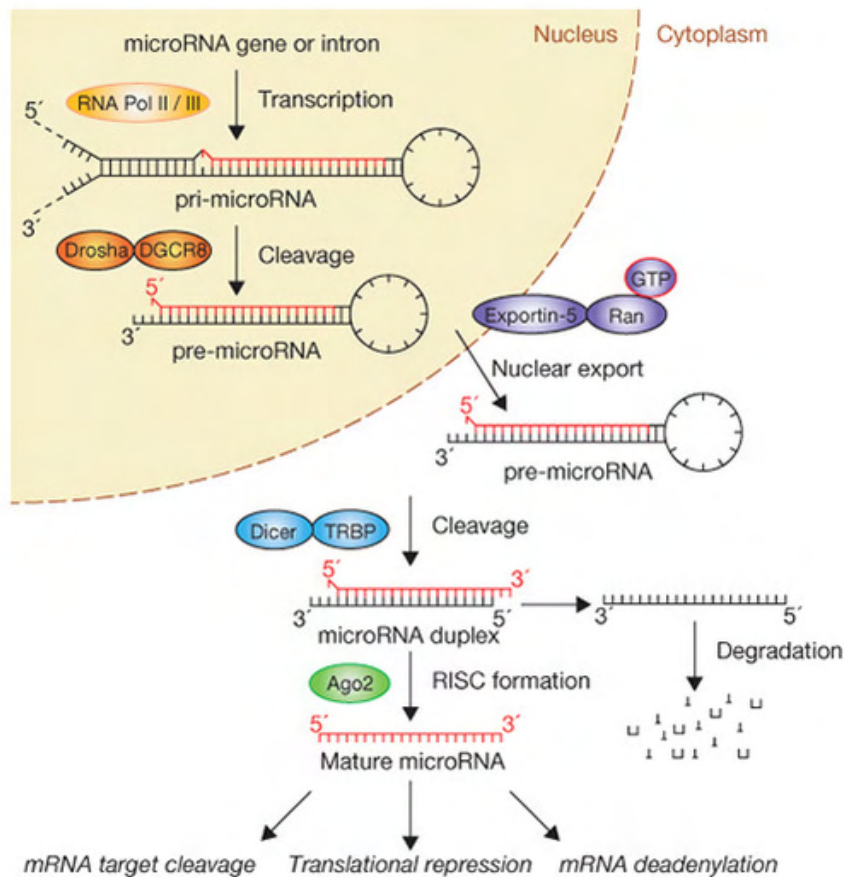
Το πρώτο microRNA (miRNA) ανακαλύφθηκε το 1993 όταν δύο ανεξάρτητες μελέτες αναγνώρισαν την πραγματική φύση του ετεροχρονικού γονιδίου lin-4 του *C. Elegans* ως μικρό μη-κωδικό RNA (small-ncRNA) [106]. Το μικρό αυτό ncRNA θεωρήθηκε ένα

εργαλείο, το οποίο χρησιμοποιούσαν τα σκωληκοειδή, για να ελέγχουν με κάποιο τρόπο την γονιδιακή έκφραση των ετεροχρονικών γονιδίων. Μετά από επτά χρόνια, οι Reinhart et al. (2000) έδειξαν ότι ένα άλλο ετερόχρονο γονίδιο του *C.elegans*, το *let-7*, αντιπροσωπεύεται επίσης από ένα μικρό ncRNA (non coding RNA) και μαζί με το RNA του *lin-4* ήταν ικανά μέσω μιας αλληλεπίδρασης RNA-RNA με την 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) των γονιδίων-στόχων, να ξεκινούν τον προσωρινό καταρράκτη ρύθμισης των ετεροχρονικών γονιδίων [107]. Αυτή η ανακάλυψη πυροδότησε την περιέργεια των επιστημόνων να αναζητήσουν και άλλα μικρά ncRNAs και το 2001 τρεις ανεξάρτητες ομάδες ταυτοποίησαν αυτά τα μικρά ncRNAs επίσης σε άλλους διαφορετικούς οργανισμούς και κυτταρικά συστήματα που έδειξαν την ύπαρξη μιας μεγάλης κατηγορίας μικρών ncRNAs με πιθανό ρυθμιστικό ρόλο που ονομάστηκε microRNAs [108]–[110]. Από τότε, τα miRNAs έχουν ανακαλυφθεί σε όλα σχεδόν τα φυτικά και ζωικά είδη και η τελευταία έκδοση της βάσης miRNA (miRBase 22) που κυκλοφόρησε τον Οκτώβριο του 2018, διακατέχει 2,654 ώριμα miRNAs στον άνθρωπο και περίπου 1,978 σε ποντίκια [111]. Τα miRNA των ζώων είναι φυλογενετικά διατηρημένα (~55% των miRNA των *C. elegans* έχουν ομόλογα στους ανθρώπους) και τα γονίδια miRNA των θηλαστικών έχουν επίσης πολλαπλές ισομορφές (παράλογα), οι οποίες πιθανώς δημιουργούνται από διπλασιασμό (το ανθρώπινο γονίδιο *let-7* αντιπροσωπεύει 8 διαφορετικές ισομορφές κατανεμημένες σε 11 γονιδιωματικούς τόπους).

1.3.1 Η Βιογένεση και Λειτουργία των microRNAs

Η πλειοψηφία των γονιδίων miRNA εντοπίζονται σε διαγονιδιακές περιοχές ή στους μη κωδικούς κλώνους γνωστών γονιδίων υποδεικνύοντας ότι σχηματίζουν ανεξάρτητες μονάδες μεταγραφής [108]–[110], [112], [113]. Το 40% των γονιδίων miRNA μπορεί να βρίσκεται σε ιντρόνια ή ακόμη και στα εξόνια άλλων γονιδίων [114]. Περίπου τα μισά από όλα τα γνωστά miRNA βρίσκονται σε κοντινή απόσταση από τα άλλα miRNAs. Αυτά τα συγκεντρωμένα miRNAs εκφράζονται ως πολυκιστρονικά πρωτογενή μετάγραφα. Μερικές περιπτώσεις έδειξαν ότι μερικά miRNAs μπορούν να μεταγραφούν από τον δικό τους υποκινητή ως μονοκιστρονικά πρωτότυπα μετάγραφα [115], [116]. Τα miRNAs παράγονται κανονικά μέσω μιας διαδικασίας πολλαπλών σταδίων που, ξεκινώντας από τον πυρήνα και τελειώνοντας

στο κυτταρόπλασμα, αποτελείται από τρία κύρια γεγονότα τα: cropping, export και dicing [113], [117]–[119] (Εικόνα 5). Αρχικά, τα γονίδια miRNA μεταγράφονται σε πρωτογενής και πολυαδενυλιωμένους προδρόμους των miRNA (pri-miRNAs) από την RNA πολυμεράση II [120]. Αυτά τα μεγάλα μετάγραφα χιλιοβάσεων χαρακτηρίζονται από δομές βρόχου-βρόχου που φιλοξενούν το ώριμο miRNA. Το ώριμο miRNA αρχικά περικόπτεται στον πυρήνα από το πυρηνικό ετεροδιμερές Droscha / DGCR8 το οποίο διασπά τα pri-miRNAs και απελευθερώνει ένα δομημένο με φουρκέτες pri-miRNA 60-100nt [121]. Το DGCR8 είναι μια πρωτεΐνη που αναγνωρίζει ~ 10 bp του στελέχους της φουρκέτας του pri-miRNA δίκλωνου RNA, προσανατολίζοντας τις καταλυτικές θέσεις του ενζύμου Droscha RNase III [122]. Οι προεξοχές ~ 2 νουκλεοτιδίων της φουρκέτας στο 3' άκρο των pre-miRNA αναγνωρίζονται από την Exportin-5 (XPO5) και την Ran-GTP, επιτρέποντας την πυρηνική εξαγωγή τους [118]. Τα pre-miRNAs διασπώνται στο κυτταρόπλασμα κοντά στον τερματικό βρόχο από την RNaseIII Dicer, απελευθερώνοντας τους δύο κλώνους του miRNA των ~22 νουκλεοτιδίων [123], [124]. Όταν παράγονται τα δύο μόρια miRNA, φορτώνονται στις πρωτεΐνες Argonaute (Ago1-4), σχηματίζοντας το σύμπλοκο RISC [125], [126]. Ένας κλώνος του διπλού RNA ~ 22 nt παραμένει στην Ago ως ένα ώριμο miRNA (ο κλώνος οδηγός), ενώ ο άλλος κλώνος καταστρέφεται. Τα miRNA κατευθύνουν τις Ago πρωτεΐνες για να στοχεύσουν mRNAs μέσω της συμπληρωματικότητας τους ως προς τα mRNA. Οι αλληλουχίες 'seed' του miRNA θεωρούνται απαραίτητες για την επιλογή των mRNA στόχων και είναι απαραίτητες για την αποσιώπηση των mRNA [127], [128]. Η τύχη του mRNA εξαρτάται από τον βαθμό συμπληρωματικότητας των βάσεων μεταξύ του μορίου mRNA και της «seed» περιοχής στο 5' άκρο του microRNA [129].



Εικόνα 5. Η οδός σύνθεσης miRNA στα ζώα. Τα γονίδια microRNA (miRNA) μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (Pol II), με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός pri-miRNA. Η Drosha, μαζί με την DGCR-8 μεσολαβεί στο στάδιο της αρχικής επεξεργασίας (πρωτογενής επεξεργασία) που παράγει pre-miRNA ~ 65 νουκλεοτιδίων (nt). Το pre-miRNA αναγνωρίζεται από την exportin 5 (EXP5) που μεσολαβεί στη μεταφορά στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα, η DICER καταλύει το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας (δευτερογενής επεξεργασία), το οποίο δημιουργεί το διπλό μόριο miRNA / miRNA*. Η Dicer, TRBP και Argonaute1-4 (Ago 1-4) είναι υπεύθυνες για την επεξεργασία του pre- miRNA και τη συναρμολόγηση του RISC (σύμπλοκο αποσιώπησης επαγόμενο από RNA). Ένας κλώνος του miRNA οδηγεί το σύμπλοκο στους συμπληρωματικούς του στόχους, το ώριμο miRNA, ενώ ο άλλος κλώνος του miRNA αποικοδομείται [130].

1.3.2 Ο ρόλος των miRNA στον καρκίνο

Τα miRNA έχουν βασικές λειτουργίες στην ανάπτυξη και στη καθιέρωση της ταυτότητας των κυττάρων και ο προβληματικός μεταβολισμός ή η έκφραση των miRNA έχει συνδεθεί με ανθρώπινες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του

καρκίνου [131]. Οι περιεχόμενες πρωτεΐνες του μηχανισμού αποσιώπησης του συμπλόκου miRISC και τα ίδια τα miRNA εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες που μεταβάλλονται στον καρκίνο, όπως η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Ορισμένα miRNAs, που αναφέρονται ως oncomiRs [132], παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στον καρκίνο και είναι ικανά να επηρεάσουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό, τη καρκινογένεση και τη μετάσταση, δρώντας είτε ως ογκογόνα είτε ως καταστολείς όγκων.

Από την ανακάλυψή τους το 1993 στον *C. elegans*, έχει γίνει όλο και πιο προφανές ότι τα miRNAs δεν ρυθμίζονται σωστά στους περισσότερους, αν όχι σε όλους, τους καρκίνους. Πολλά από αυτά τα miRNA είτε συνεισφέρουν είτε καταστέλλουν τον καρκινικό φαινότυπο αναστέλλοντας την έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή των ογκογονιδίων, αντίστοιχα. Γενικά, τα ογκογονικά miRNAs (oncomiRs) υπερεκφράζονται σε καρκίνους ενώ τα ογκοκατασταλτικά miRNAs υποεκφράζονται (tumor suppressor miRs). Όταν αυτά τα oncomiR ή τα tumor suppressor miRs αναστέλλονται ή διεγείρονται αντίστοιχα, ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, η μετάσταση και / ή η επιβίωση μπορεί να μειωθεί σημαντικά, ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου και το συγκεκριμένο miRNA που επηρεάζεται. Είναι ακόμη δυνατό για τους καρκίνους να εξαρτώνται πλήρως, ή να είναι «εθισμένοι», σε ένα oncomiR, έτσι ώστε η καταστολή του oncomiR να έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη υποχώρηση του καρκίνου [133]. Ένα παράδειγμα oncomiR είναι το miR-21. Το miR-21 είναι ένα από τα πρώτα microRNA θηλαστικών που ταυτοποιήθηκαν και ένα από τα πιο συχνά υπερεκφρασμένο miRNAs σε συμπαγείς όγκους και τα υψηλά του επίπεδα περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε λεμφώματα Β-λεμφοκυττάρων. Συνολικά, το miR-21 θεωρείται τυπικό «oncomiR», το οποίο δρα αναστέλλοντας την έκφραση των φωσφατασών, οι οποίες περιορίζουν τη δραστηριότητα σηματοδοτικών μονοπατιών όπως της AKT και MAPK. Δεδομένου ότι οι περισσότεροι από τους στόχους του miR-21 είναι ογκοκατασταλτικά γονίδια, το miR-21 συνδέεται με μια μεγάλη ποικιλία καρκίνων, συμπεριλαμβανομένης εκείνης του μαστού [134], των ωοθηκών [135], του τραχήλου της μήτρας [136], του παχέος εντέρου [137], του πνεύμονα [138], του ήπατος [139], του εγκεφάλου [140], του οισοφάγου [141], του προστάτη [138], του πάγκρεας [138], και του θυρεοειδή [142].

Επίσης, αναγνωρίζοντας τα προφίλ των miRNAs στους διάφορους καρκίνους, είναι δυνατόν η μοριακή ταξινόμηση των όγκων ανάλογα με τον τύπο και την πρόγνωση του καρκίνου [143]. Το 2008, η παρουσία των miRNAs πρωτο-αναφέρθηκε στα σωματικά υγρά (ούρα, ορό, σάλιος, πλάσμα) επιτρέποντας τη ταυτοποίηση των ατόμων με μη μεταστατικό καρκίνο [144]–[146]. Τα εκθετικά αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι οι μετρήσεις των miRNAs στον ορό ή το πλάσμα μπορούν να παρέχουν πολύτιμους βιοδείκτες για ανίχνευση διαφόρων ανθρώπινων καρκίνων [147], [148]. Τέλος, τα miRNA έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία ή στόχοι για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων [149]. Η θεραπευτική εφαρμογή των miRNAs περιλαμβάνει δύο στρατηγικές: η πρώτη αποσκοπεί στην αναστολή των ογκογόνων miRNA χρησιμοποιώντας ανταγωνιστές miRNA, γνωστά ως antagomiRs. Τα antagomiRs είναι μονοκλωνικά μόρια RNA μήκους περίπου 21-23 νουκλεοτιδίων τα οποία δρουν μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων με τα miRNAs. Έτσι οι ανταγωνιστές των miRs προσδένονται συμπληρωματικά στο ογκογόνο miRNA και δε το αφήνουν να δράσει [150]. Η δεύτερη στρατηγική, η αντικατάσταση του miRNA, περιλαμβάνει την επανεισαγωγή ενός ογκοκατασταλτικού miRNA, εφόσον έχει χαθεί η ενδογενής του έκφραση. Η επανεισαγωγή γίνεται με τη προσθήκη στα κύτταρα αλληλουχιών νουκλεοτιδίων RNA που είναι πανομοιότυπες με το ενδογενές miRNA (mimics) και μιμούνται την δράση του [151].

1.3.3 Πρόβλεψη των γονιδίων στόχων των miRNAs

Δεδομένου ότι τα miRNAs ασκούν τη λειτουργία τους ρυθμίζοντας τα mRNA στόχους, η ταυτοποίηση των γονιδίων στόχων των είναι απαραίτητη για την κατανόηση της λειτουργίας τους. Η αποτελεσματική πρόβλεψη στόχων miRNA παραμένει προκλητική λόγω της πολυπλοκότητας της αλληλεπίδρασης και της περιορισμένης γνώσης των κανόνων που διέπουν αυτές τις διαδικασίες. Η αλληλουχία ‘seed’, ο αριθμός των θέσεων στο στόχο, η θερμοδυναμική της αλληλεπίδρασης, η εξελικτική συντήρηση και το πλαίσιο της περιβάλλουσας αλληλουχίας στα mRNAs είναι μερικές από τις παραμέτρους που οι τρέχοντες υπολογιστικοί αλγόριθμοι λαμβάνουν υπόψη για την πρόβλεψη στόχων miRNA. Οι διαθέσιμοι αλγόριθμοι μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες που

καθορίζονται με βάση τη χρήση ή τη μη χρήση της εξελικτικής συντήρησης. Οι αλγόριθμοι που βασίζονται σε κριτήρια εξελικτικής συντήρησης είναι για παράδειγμα οι εξής: miRanda [152], PicTar [153], TargetScan [154], DIANA-microT [155], ενώ οι PITA [156] και RNA22 [157] ανήκουν στους αλγόριθμους που χρησιμοποιούν άλλες παραμέτρους, όπως η ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης ή δευτερογενών δομών των 3'UTRs που μπορούν να προάγουν ή να αποτρέπουν τη δέσμευση του miRNA. Παρά το γεγονός ότι έχουν διαπιστωθεί πολλές αλλαγές στην έκφραση mRNA και πρωτεϊνών μετά από αποσιώπηση ή υπερέκφραση των miRNA, το κλάσμα των άμεσων στόχων mRNA που έχουν ταυτοποιηθεί παραμένει πολύ μικρό. Η αναγνώριση των άμεσων στόχων των miRNA θα βελτιώσει την κατανόησή μας ως προς τους μηχανισμούς μετα-μεταγραφικής ρύθμισης στα κύτταρα.

1.4 Σκοπός της Εργασίας

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το γονίδιο του *Stag2* είναι ένα σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο και έχει βρεθεί μεταλλαγμένο σε πολλούς καρκίνους αλλά επίσης, η απώλεια έκφρασης της STAG2 ανιχνεύθηκε χωρίς να έχει γίνει κάποια σωματική μετάλλαξη, υποδηλώνοντας έτσι έναν άλλο μηχανισμό αποσιώπησης του STAG2. Έτσι, σημαντική είναι η απάντηση στο ερώτημα άμα το mRNA του *Stag2* ρυθμίζεται από κάποιο miRNA.

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν να ταυτοποιηθούν πιθανά microRNA τα οποία αλληλεπιδρούν με το 3'UTR του *Stag2* mRNA και τελικά οδηγούν στη μείωση του, αλλά και στη μείωση της πρωτεΐνης του με τη διαδικασία της RNA αποσιώπησης. Μετά, να ερευνηθεί το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης η αναστολής των miRNA αυτών όσον αφορά τα επίπεδα του mRNA του *Stag2* και της πρωτεΐνης STAG2. Πιο συγκεκριμένα η υπόθεση μας ήταν ότι κάποιο miRNA στοχεύει το mRNA του *Stag2* με αποτέλεσμα τη μείωση της πρωτεΐνης του. Χωρίς την πρωτεΐνη STAG2 το σύμπλοκο των κοχεσινών δεν μπορεί να λειτουργήσει σωστά με αποτέλεσμα:

1. οι αδερφές χρωματίδες δεν μπορούν να διαχωριστούν σωστά στα νέα κύτταρα με αποτέλεσμα την ανευπλοϊδία, η οποία μπορεί τελικά να καταλήξει στον καρκίνο.

2. Να αλλάζει η γονιδιακή έκφραση ή και η δομή της χρωματίνης με τελικό αποτέλεσμα τον καρκίνο.

Μέχρι σήμερα δεν έχει ανακαλυφθεί ο ακριβής τρόπος με τον οποίο οι μεταλλάξεις στις κοχεσίνες και του *Stag2* συμβάλλουν στην παθογένεια του καρκίνου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιοπληροφορική Ανάλυση

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση με τις προβλέψεις δύο προγραμμάτων, TargetScan και miRanda, προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές θέσεις στο 3'UTR του *Stag2* mRNA, οι οποίες αποτελούν στόχους miRNAs. Τα προγράμματα αυτά εντοπίζουν βιολογικούς στόχους των miRNAs με την αναζήτηση της παρουσίας διατηρημένων θέσεων 6-8 νουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικές με την αλληλουχία seed του κάθε miRNA.

2.2 Πειραματικό υλικό

2.2.1 Κυτταρικές σειρές

Για την διεξαγωγή του πειράματος της μέτρησης των ενδογενών επιπέδων mRNA των *Stag2*, miR-21 και miR-22, χρησιμοποιήθηκαν 47 διαφορετικές εμπορικές και μη κυτταρικές σειρές, οι οποίες είναι:

- 1) MDA-453 (Breast cancer): Αυτή η κυτταρική σειρά απομονώθηκε από μια γυναίκα 48 ετών με μεταστατικό καρκίνωμα του στήθους. Στα κύτταρα αυτά υπερεκφράζεται ο FGF.
- 2) PCC (Rat Pheochromocytoma Cells): Αυτή η κυτταρική σειρά απομονώθηκε από αρουραίο με φαιοχρωμοκύττωμα του επινεφριδίου.
- 3) Nthy (Human thyroid follicular epithelial): Κυτταρική σειρά από κανονικά επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδούς που τους έχει προστεθεί ο SV40 για την αθανатоποίηση τους.
- 4) T-24 (Human bladder carcinoma cell line 24): Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης.

- 5) T-470 (Breast carcinoma): Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από καρκίνωμα του στήθους.
- 6) HEK-293 και HEK293A (Human Embryonic Kidney 293): Τα κύτταρα αυτής της σειράς έχουν προέλθει από τον μετασχηματισμό ανθρώπινων εμβρυικών κυττάρων νεφρού.
- 7) SF-268 (Human Glioblastoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από ανθρώπινο γλοιοβλάστωμα.
- 8) RT-4 (Human Caucasian bladder transitional-cell carcinoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης.
- 9) A-375 melanoma (Human malignant melanoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από κακοήγη μελάνωμα.
- 10) HCT-116 (Human colon carcinoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από καρκίνωμα στο παχύ έντερο.
- 11) cNF04-9A Fibroblast (dermal neurofibroma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από ινοβλάστες δερματικού νευροϊνωματώματος.
- 12) Pn02.8 Fibroblast (Human immortalized Schwann cells): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από αθανатоποιημένους ινοβλάστες εγκεφάλου.
- 13) pNF 05.5 (Human Plexiform NeuroFibroma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από ανθρώπινο νευροϊνωμάτωμα.
- 14) 3T3 (Mouse Swiss NIH embryo): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από εμβρυικά κύτταρα ινοβλαστών ποντικίου.
- 15) pNF 05.5 Fibroblast (Human Plexiform NeuroFibroma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από ινοβλάστες ανθρώπινου νευροϊνωματώματος.
- 16) MDA-MB-231 (Human breast adenocarcinoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από αδενοκαρκίνωμα του στήθους.
- 17) SH-SY-5Y (Human neuroblastoma): Τα κύτταρα αυτά είναι μετασχηματισμένα ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος, τα οποία απομονώθηκαν από ένα κοριτσάκι 4 ετών.
- 18) Tm-31 (Human astrocytoma): Αυτή η κυτταρική σειρά αποτελείται από κύτταρα αστροκυτώματος (γλοίωμα χαμηλής κακοήθειας), τα οποία λήφθηκαν από ασθενή με νευροϊνωμάτωση τύπου 1.

- 19) PC12 (rat pheochromocytoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από φαιοχρωμοκύττωμα του επινεφριδιακού μυελού ενός αρουραίου.
- 20) S-462, 90-8, 94-3 και 96-2 (Human, Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors): Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από έναν τύπο καρκίνου στον σθηρικό ιστό γύρω από τα νευρικά κύτταρα και έχουν ληφθεί από άτομο που έπασχε από νευροϊνωμάτωση τύπου 1.
- 21) COS-7 (African Green Monkey Fibroblast-like Kidney Cells): Γι' αυτή την κυτταρική σειρά, απομονώθηκαν κύτταρα νεφρού από μαϊμού και μετασχηματίστηκαν, ώστε να εκφράζουν επιπλέον το αντιγόνο T του ιού SV40. Αυτά τα κύτταρα μοιάζουν αρκετά με ινοβλάστες.
- 22) Breast MDA-468 (Human breast adenocarcinoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από αδеноκαρκίνωμα του μαστικού αδένου.
- 23) PC-3 (Human Prostate Cancer): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από αδеноκαρκίνωμα του προστάτη.
- 24) MPNST patient 1 (Human, Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από τύπο καρκίνου στον σθηρικό ιστό γύρω από τα νευρικά κύτταρα και έχουν ληφθεί από άτομο που έπασχε από νευροϊνωμάτωση τύπου 1.
- 25) HS-888 (Human Lung): Τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν από φυσιολογικό πνεύμονα ενός Καυκάσιου άνδρα, 20 ετών.
- 26) SW-620 (Human Colon Adenocarcinoma): Αυτή η κυτταρική σειρά αποτελείται από ανθρώπινα κύτταρα κακοήγη όγκου παχέος εντέρου. Ο πιο συχνός ιστολογικός τύπος είναι το αδеноκαρκίνωμα που προέρχεται από το επιθήλιο του βλεννογόνου του παχέος εντέρου.
- 27) SK-N-SH (Human neuroblastoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από νευροβλάστωμα.
- 28) CCD-18Co (Human Colon Fibroblast): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από ινοβλάστες παχέος εντέρου.
- 29) HT-22 (Mouse Hippocampal Neuronal Cell Line): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από ιππόκαμπο ποντικού που έχει αθανатоποιηθεί από τον ιό SV-40.
- 30) Breast MCF-7 (Human Caucasian breast adenocarcinoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από αδеноκαρκίνωμα του μαστού.

- 31) U2OS (Human Bone osteosarcoma): Αυτή η κυτταρική σειρά προέρχεται από θηλυκιά ασθενή με οστεοσάρκωμα.
- 32) HeLa (Human Cervical Cancer): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.
- 33) MCF-7 (Human Caucasian breast adenocarcinoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από αδenoκαρκίνωμα του μαστού.
- 34) HL-60 (human acute promyelocytic leukemia): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από ασθενή με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία.
- 35) K-562 (Erythroleukemia cell line): Αυτή η κυτταρική σειρά προέρχεται από ασθενή με χρόνια μυελογενή λευχαιμία.
- 36) HEL (Human Erythroid Leukemia): Αυτή η κυτταρική σειρά προέρχεται από ασθενή με ερυθρολευχαιμία.
- 37) HCT-116 (Human Colorectal Carcinoma): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από καρκίνωμα στο παχύ έντερο.
- 38) H-460 (Human Lung Cancer): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από καρκίνο του πνεύμονα.
- 39) U-251 (Human Glioma): Τα κύτταρα αυτής της σειράς αποτελούν φυσιολογικά κύτταρα γλοίας ανθρώπου.
- 40) Pn-02.8 (Human immortalized Schwann cells): Κυτταρική σειρά που προέρχεται από αθανατοποιημένα κύτταρα Schwann.

Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM, το οποίο περιείχε επιπλέον 10% FBS, 100 $\mu\text{g/ml}$ πενικιλίνη και 100 $\mu\text{g/ml}$ στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα συντηρήθηκαν σε 60 mm τρυβλία, σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Όταν η πυκνότητα ήταν περίπου 80-90%, τα κύτταρα μεταφέρονταν σε νέο τρυβλίο με φρέσκο θρεπτικό μέσο, σε αραιώση 1:6, κάθε 2 ημέρες.

Αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο από το τρυβλίο με τα κύτταρα και έγινε μια πλύση με PBS. Για την αποκόλληση των κυττάρων έγινε προσθήκη διαλύματος 0,05% τρυψίνης/EDTA και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C για 5-8 λεπτά. Το διάλυμα τρυψίνης/EDTA απενεργοποιήθηκε με την προσθήκη θρεπτικού μέσου DMEM/FBS. Κατόπιν, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 1,000rpm για 1 λεπτό και

το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με DMEM/FBS. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε νέο τρυβλίο με φρέσκο θρεπτικό μέσο DMEM/FBS και επωάστηκαν στους 37°C για 2 ημέρες, μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

Όλες αυτές οι κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ημιποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) αφού προηγήθηκε απομόνωση του ολικού RNA με τη χρήση του RNeasy[®] RT (MRC) και μετά ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT). Επιπλέον, οι κυτταρικές σειρές HEK293A και U2OS χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο της διαμόλυνσης (transfection) και ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης, καθώς και για το ανοσοσύστημα κατά Western.

2.2.2 Φορείς κλωνοποίησης

Για την κλωνοποίηση του τμήματος DNA που κωδικοποιεί την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) του γονιδίου *Stag2*, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω φορείς κλωνοποίησης:

1. pCRII-TOPO[®] (Invitrogen)

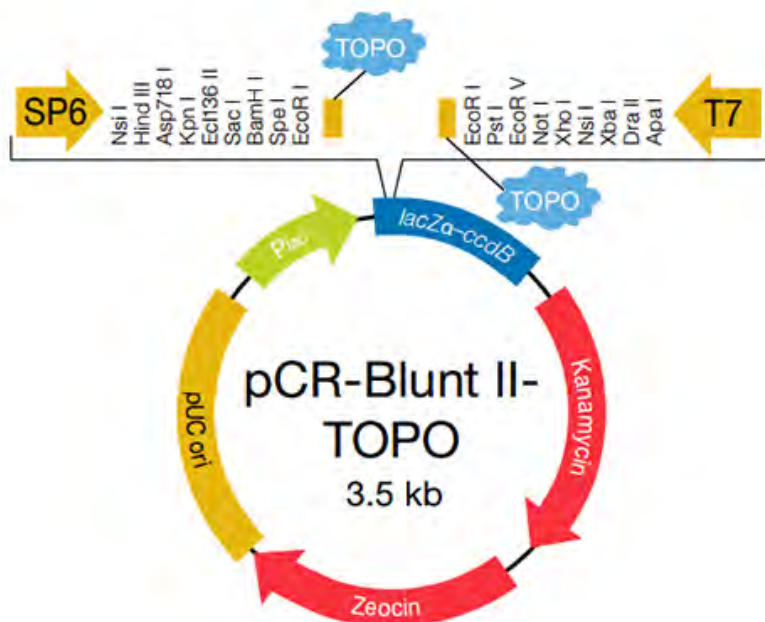
Ο πλασμιδιακός φορέας pCRII-TOPO[®] χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για το 3'UTR του γονιδίου *Stag2*, και την μετέπειτα μεταφορά του στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECKTM2. Ο πλασμιδιακός φορέας pCRII-TOPO[®], μεταξύ των άλλων, διαθέτει:

i) Τις προεξοχές ενός καταλοίπου θυμίνης (T-προεξοχές) στα 3' άκρα, οι οποίες βρίσκονται στο εσωτερικό του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης *lacZ*. Κατά την ενίσχυση του προϊόντος 3'UTR του γονιδίου *Stag2*, η πολυμεράση Taq τοποθετούσε ένα προεξέχον κατάλοιπο αδενίνης στο άκρο 3' του προϊόντος, το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί κατά την κλωνοποίησή του. Με αυτό τον τρόπο γίνεται δυνατή η σύνδεση των δύο τμημάτων DNA.

ii) Δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη και καναμυκίνη, απαραίτητα για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών *E. coli* που φέρουν το σωστό φορέα (Εικόνα 6).

Η αλληλουχία, που κωδικοποιεί το 3'UTR του γονιδίου *Stag2* του ανθρώπου, με μέγεθος 2kb, απομονώθηκε από γλοιοβλάστωμα ανθρώπου και ενισχύθηκε με PCR,

χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές. Κατόπιν αυτή η αλληλουχία εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά του 3'UTR του γονιδίου *Stag2* στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECKTM2. Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* με τους τροποποιημένους φορείς pCRII-TOPO. Τα βακτήρια που έχουν δεχθεί τον σωστό φορέα, θα πρέπει να μεγαλώσουν παρουσία Xgal και οι αποικίες να έχουν λευκό ή ανοιχτό γαλάζιο χρώμα. Κατ' αυτό τον τρόπο γίνεται αντιληπτή η απουσία έκφρασης της β-γαλακτοζιδάσης, διότι το γονίδιο lacZ διακόπτεται από το επιθυμητό ένθεμα. Στη συνέχεια, η αλληλουχία του 3'UTR του γονιδίου *Stag2* απομονώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pCR[®]II-TOPO[®] με την χρήση των περιοριστικών ενζύμων XhoI και NotI, έτοιμη πλέον να τοποθετηθεί στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECKTM2.



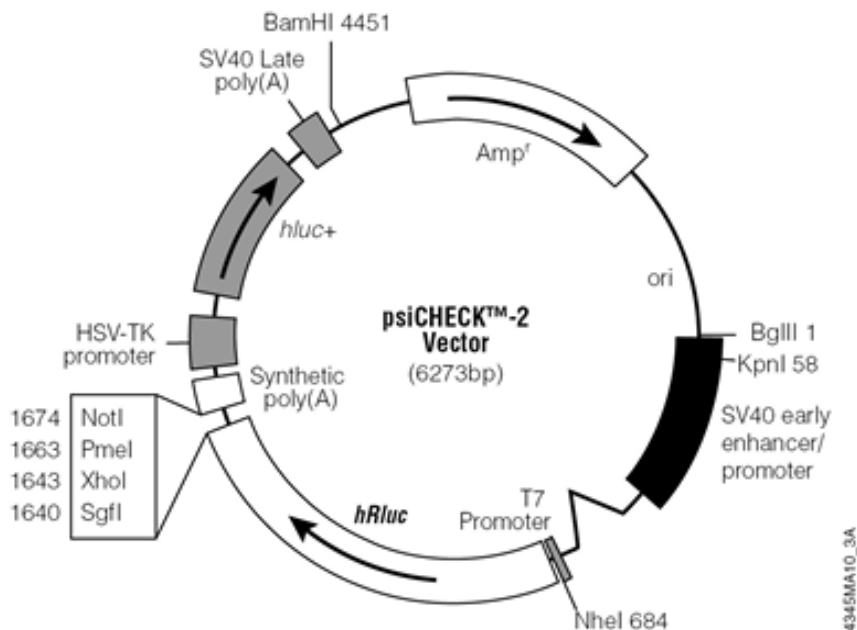
Εικόνα 6. Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCR[®]II-TOPO[®].

2. psi-CHECK2TM (Promega)

Η αλληλουχία, που κωδικοποιεί το 3'UTR του γονιδίου *Stag2*, τοποθετήθηκε καθοδικά του 3'UTR της λουσιφεράσης Renilla. Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας χρησιμοποιήθηκε για την διαμόλυνση των κυττάρων HEK293A και U2OS κατά τη μέθοδο της λουσιφεράσης. Ο φορέας psi-CHECK2TM, μεταξύ των άλλων, διαθέτει:

- i) Τις κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων της λουσιφεράσης Renilla (Synthetic Renilla luciferase gene, hRluc) και της λουσιφεράσης Firefly (Synthetic Firefly luciferase gene, hluc+), οι οποίες είναι κατασκευασμένες έτσι ώστε να έχουν αποτελεσματική έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών. Η έκφραση της Renilla χρησιμεύει για τη μέτρηση της έκφρασης του 3'UTR του γονιδίου Stag2, ενώ η Firefly λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας για την κανονικοποίηση του σήματος της Renilla,
- ii) Ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στη αμπικιλίνη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών E. Coli που φέρουν τον σωστό φορέα,
- iii) Τον υποκινητή του γονιδίου T7, ανοδικά του γονιδίου Renilla, που χρησιμοποιείται για την μεταγραφή της από την T7 RNA πολυμεράση,
- iv) Τις αλληλουχίες SV40 Synthetic poly(A) και SV40 Late poly(A), καθοδικά των γονιδίων της Renilla και της Firefly, αντίστοιχα, οι οποίες παρέχουν το σήμα για πολυαδενιλίωση των μεταγράφων και ενισχύουν την σταθερότητα αυτών και την αποτελεσματικότητα της μεταγραφής τους (Εικόνα 7).

Η εισαγωγή του προϊόντος της PCR καθοδικά του 3'UTR του γονιδίου της Renilla μέσα στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECKTM2 πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων Xho και NotI. Έπειτα πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων E. coli DH5A με τον τροποποιημένο φορέα psi-CHECKTM2, για επιλογή και απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων που έφεραν το σωστό ένθεμα (Stag2 3'UTR). Τέλος, οι φορείς, οι οποίοι έφεραν το Stag2 3'UTR, χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση των κυττάρων HEK293A και U2OS κατά την ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης.



Εικόνα 7. Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα psi-CHECK™2.

2.3 Κατασκευή των φορέων κλωνοποίησης

2.3.1 Απομόνωση του τμήματος DNA 3'UTR του γονιδίου Stag2

Η αλληλουχία του 3'UTR του γονιδίου *Stag2* απομονώθηκε από ολικό DNA γλοιοβλαστώματος με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και πραγματοποιήθηκαν πέψεις με περιοριστικά ένζυμα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύνδεσή της με τον psi-CHECK2™ φορέα.

2.3.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την συγκεκριμένη PCR σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές και το ένζυμο της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η One Taq Hot Start (NEB). Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρειάστηκαν 0.3μl DNA γλοιοβλαστώματος, τα οποία αναμείχθηκαν με 1X Standard Buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.2 pmoles από κάθε εκκινητή και 1.25 Units One Taq Hot Start σε τελικό όγκο 10 μl. Ο πολλαπλασιασμός του 3'UTR του γονιδίου *Stag2* πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή και το μίγμα αρχικά επώαστηκε στους 94°C για 20 δευτερόλεπτα, έπειτα στους 50°C για 40 δευτερόλεπτα, κατόπιν η επέκταση του τμήματος DNA έγινε στους 68°C για 3 λεπτά. Το πρόγραμμα αυτό επαναλήφθηκε για 40 κύκλους.

Στο τέλος, το μίγμα επώαστηκε στους 68°C για ακόμα 10 λεπτά, διότι αυτό το ένζυμο έχει τη δυνατότητα να τοποθετεί ένα δεοξυνουκλεοτίδιο αδενίνης στο 3' άκρο κάθε τμήματος DNA. Εφόσον διαπιστώθηκε ότι είναι δυνατή η απομόνωση του τμήματος 3'UTR του γονιδίου *Stag2*, η αντίδραση επαναλήφθηκε, αλλά αυτή τη φορά σε τελικό όγκο 50μl.

2.3.1.2 Οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την διαδικασία πολλαπλασιασμού του 3'UTR του γονιδίου *Stag2*, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 1.5% πήκτωμα αγαρόζης, λόγω του μεγάλου μεγέθους τους (2 kb). Για την παρασκευή του πηκτώματος 0.75g αγαρόζης διαλύθηκαν σε 50 ml 1X TBE με τη βοήθεια θερμότητας. Μετά το βρασμό, το μίγμα το αφήνουμε για μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προσθέτουμε 5 μl βρωμιούχο αιθιδίο (10mg/ml), ανακινούμε ελαφρά και το διάλυμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι. Έπειτα, τοποθετήθηκε ειδικό χτενάκι για τη διαμόρφωση των πηγαδιών, όπου θα προστεθούν τα δείγματα. Το πήκτωμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, μέχρι να στερεοποιηθεί. Κατόπιν, αφαιρέθηκε το χτενάκι και η συσκευή γέμισε με 0.5X TBE, μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα. Στα δείγματα προστέθηκε 1X χρωστικής για DNA και φορτώθηκε όλη η ποσότητα στα πηγαδάκια. Στο πρώτο πηγάδι του πηκτώματος φορτώθηκαν 3μl 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), που αποτελείται από μίγμα DNA γνωστών μοριακών βαρών και χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των τμημάτων DNA. Η συσκευή συνδέθηκε με το τροφοδοτικό και η τάση του ρεύματος που εφαρμόστηκε ήταν 110 Volts. Μετά τον διαχωρισμό των δειγμάτων, η ηλεκτροφόρηση σταμάτησε και το πήκτωμα φωτογραφήθηκε, κάτω από λάμπα UV, με το Dolphin Gel Documentation System.

2.3.1.3 Καθαρισμός προϊόντος PCR

Ο καθαρισμός έγινε με τη βοήθεια του QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen) ύστερα από ηλεκτροφόρηση του δείγματος. Με ένα χειρουργικό νυστέρι απομονώθηκε το κομμάτι του πηκτώματος που περιείχε το επιθυμητό τμήμα DNA και τοποθετήθηκε σε eppendorf. Το κομμάτι του πηκτώματος ζυγίστηκε και προστέθηκε ποσότητα QG Buffer ίση με 3 φορές του βάρους του κομματιού. Το

δείγμα επωάστηκε στους 50°C για 10 λεπτά, μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη, αναδεύοντας κάθε 2-3 λεπτά σε vortex. Κατόπιν, το δείγμα τοποθετήθηκε σε ειδική στήλη με φίλτρο και φυγοκεντρήθηκε στις 13,000rpm για 1 λεπτό. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πλύση της στήλης με 0.5ml PE Buffer και δύο φυγοκεντρήσεις στις 13,000rpm για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα της αιθανόλης. Η στήλη τοποθετήθηκε σε καθαρό erpendorf και προστέθηκαν 35μl EB Buffer, το οποίο είχε θερμανθεί στους 65°C. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μία τελευταία φυγοκέντρηση στις 13,000rpm για 1 λεπτό, ώστε να εκλουστεί το τμήμα DNA, το οποίο στη συνέχεια φωτομετρήθηκε.

2.3.1.4 Εισαγωγή στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO®

Για την εισαγωγή της αλληλουχίας 3'UTR του γονιδίου *Stag2* στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO®, χρειάστηκαν 2μl του τμήματος DNA, 0.5μl άλατος (Salt) και 0.5μl πλασμιδίου. Το μίγμα επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με το παραπάνω μίγμα. Όσες αποικίες είχαν τον φορέα με το επιθυμητό ένθεμα, καλλιεργήθηκαν και έγινε απομόνωση των πλασμιδίων.

2.3.1.5 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Επιλέχθηκε ένα από τα παραπάνω πλασμίδια, που περιείχε το σωστό ένθεμα, και πραγματοποιήθηκε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και NotI-HF (NEB). 35 μl πλασμιδίου αναμίχθηκαν με 1X Buffer 4 NEB, 1X BSA και 16 units από το κάθε ένζυμο σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37 °C για 3 ½ ώρες. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης και απομονώθηκαν με τη βοήθεια του QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen), όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.3.2 Εισαγωγή του 3'UTR του γονιδίου *Stag2* στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECK2

Για την εισαγωγή της αλληλουχίας 3'UTR του γονιδίου *Stag2* στον πλασμιδιακό φορέα psi-CHECK2, υπολογίστηκαν *in silico* οι απαιτούμενες ποσότητες για την πραγματοποίηση της σύνδεσης. Έτσι, για τα 96ng ενθέματος της αλληλουχίας 3'UTR του γονιδίου *Stag2* χρειάστηκαν 50ng πλασμιδιακού φορέα, ο οποίος είχε κοπεί με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα με τα οποία είχε γίνει και πέψη στο ένθεμα. Το μίγμα συμπληρώθηκε με 1X Ligase Buffer και 20 units λιγάσης (Takara), η οποία έχει τη δυνατότητα να καταλύει τη σύνδεση τμημάτων DNA. Ο τελικός όγκος του μίγματος ήταν 10 μl και η αντίδραση έγινε στους 16°C όλη τη νύχτα. Έπειτα ακολούθησε μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων με τα 5μl του μίγματος, έγινε έλεγχος των αποικιών με Colony PCR, καλλιέργεια των αποικιών που έφεραν το σωστό πλασμίδιο και απομόνωση του πλασμιδίου.

2.4 Κλωνοποίηση

Για την αποθήκευση των πλασμιδιακών φορέων και για τα πειράματα κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε η βακτηριακή κυτταρική σειρά *Escherichia coli* DH5α.

2.4.1 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων για την εισαγωγή πλασμιδίων

Αρχικά, έγινε επίστρωση κυττάρων *E. coli* DH5α σε τρυβλίο διαμέτρου 10 cm με θρεπτικό υλικό άγαρ, χωρίς τη παρουσία αντιβιοτικού, και επώαση αυτών σε θερμοκρασία 37°C. Τη δεύτερη μέρα, έγινε επιμόλυνση σε falcon με 6ml θρεπτικού υλικού και επωάστηκε σε αναδευτήρα στους 20-22°C και 220-250rpm. Την τρίτη μέρα έγινε επιμόλυνση με 1ml από το falcon σε μια κωνική φιάλη με 100 ml θρεπτικού υλικού και 10mM MgCl₂ και επωάστηκε στους 20-22°C και τουλάχιστον 220 rpm. Συχνά λαμβάναμε ~500 μl του δείγματος και το φωτομετρούσαμε. Όταν η απορρόφηση του δείγματος έφτασε OD_{595nm} = 0.4-0.6, τοποθετήσαμε τη φιάλη σε δωμάτιο θερμοκρασίας 4°C. Όλες οι διαδικασίες και τα διαλύματα από αυτό το σημείο κι έπειτα έπρεπε να βρίσκονται σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθως, έγινε διαχωρισμός της υγρής καλλιέργειας σε 2 falcon των 50ml και φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου έγινε επαναιώρηση των κυττάρων κάθε σωληναρίου σε 10 ml διαλύματος TB (10mM

HEPES, 15mM CaCl₂, 55mM MnCl₂, 250mM KCl), συνένωση των δύο εναιωρημάτων κυττάρων και ψύξη για 10 λεπτά στον πάγο. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στις 3,000rpm για 10 λεπτά και πάλι απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Ακολούθησε αναδιασπορά των κυττάρων σε 4ml διαλύματος TB, εκ των οποίων τα 280μl ήταν DMSO. Τέλος, μοιράστηκαν 60μl από το αιώρημα των κυττάρων σε κάθε erpendorf tube, ψύχθηκαν αμέσως με τη χρήση υγρού αζώτου και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

2.4.2 Μετασχηματισμός κυττάρων

Αρχικά, τοποθετήσαμε το erpendorf με το αιώρημα των κυττάρων, που είναι δεκτικά σε πλασμίδια, από τους -80°C σε πάγο, ώστε η απόψυξη των κυττάρων να γίνει με ομαλό τρόπο. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη του πλασμιδιακού DNA, τόση ώστε να μη ξεπερνά το 1/10 του όγκου των κυττάρων που βρίσκονται στο erpendorf, και επώαση στον πάγο 15-30 min. Κατά τη διάρκεια αυτών των λεπτών, ανά ~4 λεπτά γινόταν μια ήπια ανακίνηση. Ακολούθως, έγινε επώαση για 30 δευτερόλεπτα στους 42°C και αμέσως μετά επώαστηκαν για 2-5 λεπτά και πάλι στον πάγο. Έπειτα έγινε προσθήκη 900μl θρεπτικού υλικού στα κύτταρα και επώασή τους στους 37°C για 1 ώρα, προκειμένου να εκφραστεί το γονίδιο ανθεκτικότητας για το εκάστοτε αντιβιοτικό. Μετά το πέρας της 1 ώρας πραγματοποιήθηκε καθίζηση των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 3,000rpm για 5 λεπτά, αφαίρεση της μισής ποσότητας του υπερκειμένου και αναδιασπορά των κυττάρων με την υπόλοιπη ποσότητα του υπερκειμένου. Το τελευταίο στάδιο του μετασχηματισμού των κυττάρων περιλαμβάνει την επιμόλυνση τρυβλίων διαμέτρου 10 cm με θρεπτικό υλικό LB άγαρ (Sigma Aldrich) που περιείχαν αντιβιοτικό για την επιλογή των κατάλληλων αποικιών των βακτηρίων, οι οποίες αναπτύχθηκαν στους 37°C μέσα σε 12-16 ώρες.

2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε αποικία (Colony PCR)

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη PCR είναι το ίδιο με αυτό που έγινε η απομόνωση της εκάστοτε αλληλουχίας DNA, με τη διαφορά ότι ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιούνται διάφορες αποικίες βακτηρίων και όχι

το ολικό DNA του γλοιοβλαστώματος. Μ' αυτό τον τρόπο, όσες αποικίες έδωσαν κατά την ηλεκτροφόρηση το επιθυμητό τμήμα DNA στο κατάλληλο μέγεθος ήταν και αυτές που επιλέχτηκαν για την περεταίρω καλλιέργειά τους με τον σωστό, πλέον, πλασμιδιακό φορέα.

2.4.4 Καλλιέργεια βακτηρίων

Για την καλλιέργεια βακτηρίων που φέρουν τον σωστό πλασμιδιακό φορέα, έγινε λήψη μιας διακριτής αποικίας από την στερεή καλλιέργεια και ακολούθησε επιμόλυνση μικρής φιάλης καλλιέργειας με 6 ml θρεπτικό υλικό LB broth (Sigma Aldrich), παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού. Στη συνέχεια η υγρή καλλιέργεια επωάστηκε σε αναδευτήρα στους 37°C για 12-16 ώρες.

2.4.5 Απομόνωση πλασμιδιακών φορέων

Η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων έγινε με τη χρήση του GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich). Αρχικά, από τα 5.5 ml έγινε συλλογή των βακτηρίων μετά από διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 13,000rpm για 1 λεπτό. Έγινε επαναδιάλυση των κυττάρων με 200μl Resuspension Solution και λύση αυτών με την προσθήκη 200μl Lysis Solution. Τα βακτήρια παρέμειναν με τα παραπάνω διαλύματα για 5 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν ακόμη 350 μl Neutralization Solution, ώστε να σταματήσει η λύση των κυττάρων. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13,000rpm για 10 λεπτά. Έγινε προετοιμασία της στήλης με το φίλτρο, το οποίο συγκρατεί τους πλασμιδιακούς φορείς, με την προσθήκη 500 μl Column Preparation Solution, τοποθετήθηκε μέσα σε erpendorf και φυγοκεντρήθηκε στις 13,000rpm για 1 λεπτό. Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος, μεταφέρθηκε το καθαρό μίγμα από τη φυγοκέντρηση των λυμένων κυττάρων στη στήλη με το φίλτρο. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 13,000rpm του 1 λεπτού, ώστε να περάσει όλη η ποσότητα των λυμένων κυττάρων από το φίλτρο. Ακολούθως, προστέθηκαν 500μl Optional Wash Solution στη στήλη, έγινε φυγοκέντρηση στις 13,000rpm για 1 λεπτό και αφαιρέθηκε το διάλυμα. Έγινε προσθήκη 750μl Wash Solution και δύο φυγοκεντρήσεις στις 13,000rpm για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα της αιθανόλης, η οποία περιέχεται

στο τελευταίο διάλυμα. Τέλος, η στήλη με το φίλτρο μεταφέρθηκε σε καθαρό erpendorf, προστέθηκαν 80μl Elution Solution, το οποίο είχε ζεσταθεί στους 65°C, έγινε φυγοκέντρηση στις 13,000rpm για 1 λεπτό και το διαλυμένο πλασμίδιο φωτομετρήθηκε.

2.4.6 Αποθήκευση μετασχηματισμένων κυττάρων

Το υπόλοιπο 0.5ml από την καλλιέργεια των βακτηρίων που περίσσεψε, αναμίχθηκε με 0.5ml 50% αποστειρωμένης γλυκερόλης και φυλάχθηκε στους -80°C για μελλοντική χρήση.

2.5 Διαμόλυνση

Με τον όρο διαμόλυνση εννοούμε την εισαγωγή ξένων νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) σε κύτταρα θηλαστικών. Στην παρούσα εργασία η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των λιπιδίων σε κύτταρα HEK293A και U2OS. Ως λιπίδιο χρησιμοποιήθηκε το jetPRIME (Polyplus) το οποίο αποτελεί κατιοντικό μόριο και παρέχει υψηλά επίπεδα διαμόλυνσης, χωρίς να προκαλεί μεγάλη καταπόνηση των κυττάρων. Για την διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν τα mimics και inhibitors των κοντρόλς και miR-21, miR-22, miR-101, και miR-124. Η αλληλουχία αυτών είναι:

	MIMICS	INHIBITORS
scramble	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT ACGUGACACGUUCGGAGAATT	-
miR-67	UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA UACUCUUUCUAGGAGGUUGUGAUU	-
scramble	-	CAGUACUUUUGUGAUGUACAA
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA AACAUACAGUCUGAUAAGCUAUU	UCAACAUCAGUCUGAUAAGCUA
miR-22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU AGUUCUUCAACUGGCAGCUUUU	ACAGUUCUUCAACUGGCAGCUU
miR-101	UACAGUACUGUGAUAACUGAA CAGUUUAUCACAGUACUGUAUU	UUCAGUUUAUCACAGUACUGUA
miR-124	UAAGGCACGCGUGAAUGCC CAUUCACCGCGUGCCUUUUU	GGCAUUCACCGCGUGCCUUA

2.5.1 Διαμόλυνση των κυττάρων HEK293A και U2OS με τον φορέα psi-CHECK2TM και με τα ολιγονουκλεοτίδια

Η διαμόλυνση των κυττάρων HEK293A και U2OS για ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης έγινε μία ημέρα μετά την επίστρωση των κυττάρων σε πιάτο 48 οπών και την επώασή τους στους 37°C σε θρεπτικό μέσο DMEM/FBS. Αρχικά, αναμίχθηκαν 20μl διαλύματος του buffer του λιπιδίου (jetPRIME buffer) με 0.15 μg/μl psi-CHECK2-Stag2 3'UTR και 3μl από τα ολιγονουκλεοτίδια είτε mimics είτε inhibitors, ανά συνθήκη. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν 20 μl JetPrime buffer, που περιείχαν 1.2μl JetPrime και τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, το περιεχόμενο κάθε συνθήκης μεταφέρθηκε στο πιάτο 48 οπών, όπου αναπτύσσονταν τα κύτταρα HEK293A και U2OS σε θρεπτικό DMEM/FBS. Το πιάτο τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο, θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας 5% CO₂ για 48 ώρες, μέχρι την συλλογή των κυττάρων για ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης.

2.6 Ανάλυση με τη μέθοδο της Λουσιφεράσης

Η ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης των διαμολυσμένων κυττάρων HEK293A και U2OS με τον φορέα psi-CHECK2-Stag2 3'UTR και των ολιγονουκλεοτιδίων, πραγματοποιήθηκε 48 ώρες μετά την διαμόλυνση τους, με τη χρήση του Dual-Luciferase Reporter Kit (Promega). Αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM/FBS από το πιάτο και έγινε μία πλύση με DPBS. Στη συνέχεια, προστέθηκε σε κάθε οπή 120 μl Lysis Buffer 1X, αραιωμένο με ultra pure H₂O, για διάλυση των κυττάρων, και 20 μl από τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ειδικούς σωλήνες. Ακολούθησε προσθήκη σε κάθε σωλήνα 50 μl αντιδραστηρίου Dual-Glo Luciferase και τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε σκιερό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 10 λεπτών μετρήθηκε η έκφραση της λουσιφεράσης Firefly με τη βοήθεια λουμινόμετρου Lumat LB9507. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 50μl αντιδραστηρίου Dual-Stop & Glo 1:50 Stop & Glo Substrate. Έγινε επώαση των κυττάρων για 10 λεπτά σε σκιερό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε μέτρηση της έκφρασης της λουσιφεράσης

Renilla στο λουμινόμετρο. Οι τιμές από την έκφραση της λουσιφεράσης Firefly χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των τιμών από την έκφραση της λουσιφεράσης Renilla. Η μείωση της έκφρασης του Stag2 3'UTR από τα miRNAs υπολογίστηκε από το λόγο των τιμών της έκφρασης της Renilla προς τις τιμές της έκφρασης της Firefly και τη διαφορά αυτών με τον μάρτυρα ελέγχου.

2.7 Απομόνωση RNA από κύτταρα και ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με Real Time PCR

Η μέθοδος της Real Time PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της έκφρασης του mRNA του *Stag2* στα HEK293A κύτταρα τα οποία είχαν διαμολυνθεί με τα ολιγονουκλεοτίδια των mimics και inhibitors των miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124. Η συλλογή των κυττάρων και η απομόνωση του ολικού RNA από αυτά έγινε 48 ώρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων. Επίσης, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της έκφρασης των ενδογενών mRNA του *Stag2*, miR-21 και miR-22 σε 47 διαφορετικές κυτταρικές σειρές.

2.7.1 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από κάθε κυτταρική σειρά πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του RNeasy® RT (MRC). Πρώτα απ' όλα, απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο από το πιάτο με τα κύτταρα και έγινε μία πλύση με DPBS. Εν συνεχεία, σε κάθε οπή του πιάτου προστέθηκαν 300 μl του RNeasy® RT και ακολούθησε ανάδευση, ώστε να προκληθεί διάλυση των κυττάρων, και το ομογενοποίημα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια τύπου errendorf. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κάθε errendorf 100μl διπλά αποστειρωμένο H₂O (γH₂O) στα οποία το 1μl είναι PC152 (precipitation carrier). Στη συνέχεια πραγματοποιείται vortex για 15 δευτερόλεπτα και τα δείγματα επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 18°C, 13,000rpm για 10 λεπτά. Μετά τοποθετήθηκε το υπερκείμενο σε νέο errendorf και προστέθηκε 1μl BAN. Έπειτα, έγινε vortex για 15 δευτερόλεπτα και επώαση 5 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου. Μετά ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 18°C, 13,000rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέο tube και προστίθονται 350μl ισοπροπανόλης. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάστηκαν στους -20°C για 30 λεπτά. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση στους 4°C, 13,000 rpm για 30 λεπτά και μετά πετάχτηκε το υπερκείμενο. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με 75% αιθανόλη και φυγοκέντρηση στους 4°C, 13,000rpm για 3 λεπτά και μετά από κάθε φυγοκέντρηση πετάχτηκε το υπερκείμενο. Τέλος, η πελέτα αποξηραίνεται καθώς τα δείγματα παρέμειναν με ανοιχτό το καπάκι για μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη, και έπειτα πραγματοποιήθηκε διαλυτοποίηση του ιζήματος με 20-50μl γH₂O, ελεύθερο από RNάσες, ανάλογα με το μέγεθος της πελέτας. Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων από την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm με τη χρήση φωτόμετρου. Τέλος, το RNA από κάθε δείγμα φυλάχτηκε στους -80°C, μέχρι την χρήση του.

2.7.2 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT)

Αρχικά, 500ng RNA αναμείχθηκαν με 10μM τυχαίων εξαμερών εκκινητών (Invitrogen), 1mM dNTPs και προστέθηκε γH₂O σε τελικό όγκο 10μl. Τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή στους 65°C για 5 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετήθηκαν σε πάγο. Ακολούθησε, σε κάθε δείγμα, προσθήκη 4 μl 5X First Strand Buffer, 2 μl διθειοθρεϊτόλης (Dithiothreitol, DTT) και 0.5μl ενζύμου M-MLV RT, το οποίο καταλύει την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA στους 37°C. Στα δείγματα προστέθηκε DEPC H₂O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και ένας μάρτυρας ελέγχου, ο οποίος περιείχε RNA και όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια, εκτός από το ένζυμο. Τα δείγματα επωάστηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή σε θερμοκρασία 25°C για 10 λεπτά, 37°C για 1 ώρα, 75°C για 15 λεπτά και 4°C για 5 λεπτά, οπότε και αφαιρέθηκαν από τη συσκευή και αραιώθηκαν με 220μl ultra pure H₂O. Τέλος, τα δείγματα φυλάχτηκαν στους -20°C μέχρι τη χρήση τους.

2.7.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (PCR)

Αρχικά προετοιμάστηκε το primer mix για κάθε ζεύγος εκκινητών. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών ήταν 1pmol/μl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ειδικές μικροπλακέτες (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, Roche). Σε κάθε θέση προστέθηκαν 10μl δείγματος cDNA αραιωμένου με H₂O, 2mM dNTPs, 2 μl Dream Taq buffer 0,9 μl syber green, 0,09 Dream Taq polymerase και H₂O σε τελικό όγκο 20μl. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου, δείγματα στα οποία αντί cDNA προστέθηκε H₂O. Στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε η έναρξη των αντιδράσεων. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 30 κύκλοι ενίσχυσης. Οι primers που στοχεύουν τα επιμέρους γονίδια έχουν τις εξής ακολουθίες: Stag2:

F 5'-TCCTTCTGGTCCAAACCGAAT-3'

R 5'-ACCGACTGCATAGCACTCTTG-3'

miR-21: F 5'-GCAGTAGCTTATCAGACTGAT-3'

R 5'-CGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCAACA-3'

miR-22: F 5'-GAAGCTGCCAGTTGAAGA-3'

R 5'-GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTACAGTT-3'

GAPDH: F 5'-GCACCACCAACTGCTTAG-3'

R 5'-GCCATCCACAGTCTTCTG-3'

U6: F 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'

R 5'-TTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'

Η real time PCR πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα LightCycler 480 της Roche. Ακολούθησε κανονικοποίηση των τιμών C_T έναντι των housekeeping genes (GAPDH, U6) με τη μέθοδο ΔΔC_T (Pfaffl 2001), για τη σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

2.8 Ανοσοσύπωμα κατά Western

Το ανοσοσύπωμα κατά Western χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης STAG2 στα κύτταρα HEK293A και U2OS τα οποία είχαν διαμολυνθεί με τα ολιγονουκλεοτίδια των mimics και inhibitors των miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124. Η συλλογή των κυττάρων και η απομόνωση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων έγινε 48 ώρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων.

2.8.1 Συλλογή των κυττάρων

Αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο από το πιάτο με τα κύτταρα HEK293A και U2OS και έγινε πλύση με DPBS. Σε κάθε οπή του πιάτου προστέθηκαν 100-120 μl από το διάλυμα λύσης των κυττάρων. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια τύπου errendorf και τοποθετήθηκαν στην ανάδευση στον πάγο για 30 λεπτά. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000rpm, για 30 λεπτά στους 4°C. Τέλος, το υπερκείμενο στο οποίο περιέχονται όλες οι διαλυτές πρωτεΐνες μεταφέρεται σε νέο σωλήνα, στον οποίο προστίθεται 6x Laemli, θερμαίνεται στους 100°C για 5 λεπτά και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12% και οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος, λόγω της παρουσίας του SDS στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Το SDS αποτελεί ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο φορτίζει αρνητικά όλες τις πρωτεΐνες, έτσι ώστε να γίνει ο διαχωρισμός τους με βάση μόνο το μοριακό τους βάρος, και όχι το pH τους.

2.8.2.1 Προετοιμασία του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στο ανοσοσύστημα κατά Western αποτελείται από δύο πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοίβαξης και το πήκτωμα διαχωρισμού, τα οποία διαφέρουν στην πυκνότητά τους και τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο. Το πήκτωμα επιστοίβαξης έχει μικρότερη πυκνότητα, έτσι ώστε όλα τα δείγματα να κινηθούν μαζί έως τα όρια του πηκτώματος διαχωρισμού. Το πήκτωμα διαχωρισμού χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των δειγμάτων με βάση το μοριακό τους βάρος.

Πρώτα απ' όλα, συναρμολογήθηκε η συσκευή προετοιμασίας του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης, η οποία αποτελείται από μία βάση πάνω στην οποία τοποθετήθηκε κάθετα μια θήκη, που είχε δύο εφαπτόμενα μικρά τζάμια. Εν συνεχεία, σε falcon παρασκευάστηκε 12% πήκτωμα διαχωρισμού, το οποίο

αποτελείται από ultra pure H₂O, πολυακρυλαμίδη, Tris 1,5M (pH 8,8), SDS, APS και TEMED. Το πήκτωμα διαχωρισμού προστέθηκε ανάμεσα στα δύο τζάμια και η πάνω επιφάνειά του καλύφθηκε με μια λεπτή στιβάδα 80% βουτανόλης, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες που δημιουργήθηκαν και να είναι ίσια η πάνω στιβάδα. Το πήκτωμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, μέχρι να γίνει ο πολυμερισμός της πολυακρυλαμίδης. Μετά τα 15 λεπτά, αφαιρέθηκε η βουτανόλη και πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με νερό, για να απομακρυνθεί και η περίσσεια της βουτανόλης, και καθαρισμός των τζαμιών με διηθητικό χαρτί. Ακολούθησε η παρασκευή του πηκτώματος επιστοιβάξης, που περιείχε ultra pure H₂O, πολυακρυλαμίδης, Tris 1M (pH 6,8), SDS, APS και TEMED. Το πήκτωμα επιστοιβάξης προστέθηκε ανάμεσα στα δύο τζάμια, πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού και στην πάνω πλευρά του τοποθετήθηκε ειδικό χτενάκι, πάχους 1,5 mm. Το πήκτωμα αφέθηκε στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, ώστε να πολυμεριστεί η πολυακρυλαμίδη.

2.8.2.2 Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Αρχικά, τα τζάμια με το πήκτωμα αφαιρέθηκαν από τη συσκευή προετοιμασίας του πηκτώματος και τοποθετήθηκαν στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το κέντρο και η κάτω πλευρά της συσκευής συμπληρώθηκαν με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) SDS-PAGE 1X και αφαιρέθηκε και το ειδικό χτενάκι. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε heatblock στους 100 °C για 5 λεπτά, αναδεύτηκαν με vortex και φυγοκεντρήθηκαν στα 7.000 rpm για 1 δευτερόλεπτο. Πριν τοποθετηθούν τα δείγματα στα πηγαδάκια, έγινε καθαρισμός των τελευταίων με το διάλυμα SDS-PAGE 1X. 10-30 µg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος φορτώθηκαν σε κάθε πηγάδι του πηκτώματος και στο πρώτο πηγάδι προστέθηκαν 2,5 µl PageRuler Prestained Protein Ladder, ο οποίος αποτελείται από μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους και χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των μελετώμενων πρωτεϊνών. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκε σε κουτί με πάγο, συνδέθηκε με το τροφοδοτικό και η τάση του ρεύματος ρυθμίστηκε αρχικά στα 125 Volts, μέχρι τα δείγματα να περάσουν από το πήκτωμα επιστοιβάξης στο πήκτωμα διαχωρισμού, και στη συνέχεια αυξήθηκε στα 175 Volts. Τα δείγματα αφέθηκαν να

ηλεκτροφορηθούν για 1 ώρα περίπου, παρατηρώντας συνεχώς τις ζώνες του μάρτυρα.

2.8.3 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Για κάθε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ετοιμάστηκαν δύο μικρά σφουγγαράκια, τέσσερα χαρτιά Whatman και μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, κομμένα στο μέγεθος του πηκτώματος. Λίγο πριν το τέλος της ηλεκτροφόρησης, τα χαρτιά Whatman και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμποτίστηκαν σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer 1X). Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων, απομακρύνθηκαν τα δύο τζάμια από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αφαιρέθηκε από τα τζάμια με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας και ξεπλύθηκε με ddH₂O. Στη συνέχεια, το πήκτωμα τοποθετήθηκε πάνω από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσα στο Transfer Buffer 1X. Σε ειδική θήκη τοποθετήθηκαν με τη σειρά ένα μικρό σφουγγάρι, δύο χαρτιά Whatman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, δύο χαρτιά Whatman και το δεύτερο μικρό σφουγγάρι. Κατόπιν, η ειδική θήκη τοποθετήθηκε κάθετα στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, η οποία συμπληρώθηκε μέχρι πάνω με Transfer Buffer 1X. Μέσα στη συσκευή τοποθετήθηκε επίσης ειδική παγοκύστη. Η συσκευή ηλεκτρομεταφοράς τοποθετήθηκε σε κουτί με πάγο, συνδέθηκε με το τροφοδοτικό και η ένταση του ρεύματος ρυθμίστηκε στα 400 mA. Η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διήρκησε 1.5 ώρες.

2.8.4 Κάλυψη μη ειδικών θέσεων

Μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αφαιρέθηκε από τη θήκη και τοποθετήθηκε σε δοχείο με 25ml διαλύματος Blocking Buffer. Το Blocking Buffer περιείχε 5% σκόνη γάλακτος διαλυμένη σε TBST 1X. Το δοχείο με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετήθηκε σε αναδευτήρα και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις.

2.8.5 Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές αντίσωμα

Ως πρωτογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν το πολυκλωνικό αντίσωμα goat SC-54512 έναντι της STAG2 (SantaCruz) και το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του GAPDH συζευγμένο με HRP (Proteintech). Τα αντισώματα διαλύθηκαν, σε αραιώση 1:500 και 1:10,000, αντίστοιχα, σε διάλυμα TBST 1X, που περιείχε 5% BSA και 0.5% sodium azide. Μετά το πέρας της επώασης της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το Blocking Buffer, πραγματοποιήθηκε μία γρήγορη πλύση με TBST 1X στη μεμβράνη και στη συνέχεια κόπηκε κατά μήκος σε κομμάτια, ανάλογα με το μοριακό βάρος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Κάθε κομμάτι τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό δοχείο, το οποίο περιείχε 6 ml από το αντίστοιχο αντίσωμα. Τα δοχεία επωάστηκαν πάνω σε αναδευτήρα στους 4 °C για όλη τη νύχτα.

2.8.6 Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το δευτερογενές αντίσωμα

Ως δευτερογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα rabbit anti-goat A5420 το οποίο ήταν συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανιού (Horse Radish Peroxidase, HRP) έναντι του πρωτογενούς αντισώματος για τη STAG2. Το αντίσωμα αραιώθηκε 1:20,000 σε διάλυμα TBST 1X. Πρώτα απ' όλα, απομακρύνθηκε το πρωτογενές αντίσωμα από κάθε δοχείο και έγιναν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών πάνω σε αναδευτήρα με TBST 1X. Κατόπιν, κάθε κομμάτι της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης επωάστηκε με 6ml του αντίστοιχου δευτερογενούς αντισώματος πάνω σε αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά την 1 ώρα, το δευτερογενές αντίσωμα απομακρύνθηκε και έγιναν 3 πλύσεις των 5 λεπτών πάνω σε αναδευτήρα με TBST 1X.

2.8.7 Εμφάνιση πάνω σε φιλμ

Αρχικά, τοποθετήθηκε ένα τζάμι μέσα στην ειδική κασέτα, πάνω στο τζάμι συναρμολογήθηκαν τα κομμάτια της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης και καλύφθηκαν με ζελατίνα. Έπειτα αναμίχθηκαν 500 μl από το αντιδραστήριο A με 500μl από το

αντιδραστήριο B, του Western ECL και προστέθηκαν πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Το διάλυμα ECL (Enhanced Chemiluminescence) είναι μίγμα H_2O_2 και λουμινόλης, που αντιδρά με το ένζυμο HRP του δευτερογενούς αντισώματος. Η HRP διασπά το H_2O_2 και παράγονται ρίζες O_2 , οι οποίες αντιδρούν με τη λουμινόλη και απελευθερώνουν φωτόνια που προσβάλλουν το φωτογραφικό φιλμ. Μέσα σε σκοτεινό θάλαμο, τοποθετήθηκε πάνω από τη ζελατίνα, που καλύπτει τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ένα φωτογραφικό φιλμ, η κασέτα κλείστηκε και αφέθηκε για κατάλληλο χρόνο, ώσπου να γίνει η αντίδραση και να αποτυπωθούν οι ζώνες των πρωτεϊνών από τη μεμβράνη στο φιλμ. Η εμφάνιση του φιλμ έγινε σε ειδικό μηχάνημα εμφάνισης μέσα στο σκοτεινό θάλαμο. Το φιλμ σαρώθηκε και η ένταση του φωτισμού κάθε πρωτεϊνικής ζώνης αναλύθηκε με το πρόγραμμα ImageJ.

2.9 Διαλύματα

2.9.1 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR

Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 2.5X: για την παρασκευή πυκνού διαλύματος αναμίχθηκαν 5.39g Tris-Base, 2.75g Boric Acid και 0.37g EDTA και διαλύθηκαν σε $\gamma\text{H}_2\text{O}$. Το pH ρυθμίστηκε στο 8.4. Για την παρασκευή 0,5X διαλύματος 20ml TBE 2.5X αραιώθηκαν με 60ml $\gamma\text{H}_2\text{O}$.

2.9.2 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στο ανοσοσύστημα κατά Western

- Διάλυμα για τη λύση των κυττάρων: Παρασκευάστηκε διάλυμα 25 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100. Χρησιμοποιήθηκε μείγμα αναστολέων πρωτεασών (complete™ Mini, Protease Inhibitors Cocktail Tablets, Roche Diagnostics Corporation) και, όπου κρίθηκε απαραίτητο, το μείγμα αναστολέων φωσφατασών (PhosSTOP™, Roche).
- Μείγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για τις πρωτεΐνες: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific).
- Laemmli Buffer 6X: 375 Mm Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.03% bromophenol blue. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους -20°C .

- Protran® μεμβράνες νιτροκυτταρίνης: Χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά των πρωτεϊνών και ήταν της εταιρείας Whatman.
- Αντιδραστήρια ECL: Χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της χημειοφωταύγειας και ήταν της εταιρείας BIO-RAD.
- SDS-PAGE 5X (Running Buffer): 15.1g/l Tris-Base και 72g/l γλυκίνης σε ddH₂O. Στο τελικό διάλυμα προστέθηκε SDS έτσι ώστε να έχει περιεκτικότητα 0.1%.
- Transfer Buffer 1X: 2lt διαλύματος περιέχουν 12.1g Tris-Base, 58g γλυκίνης, 2g SDS και 400mL μεθανόλης.

2.10 Στατιστική επεξεργασία

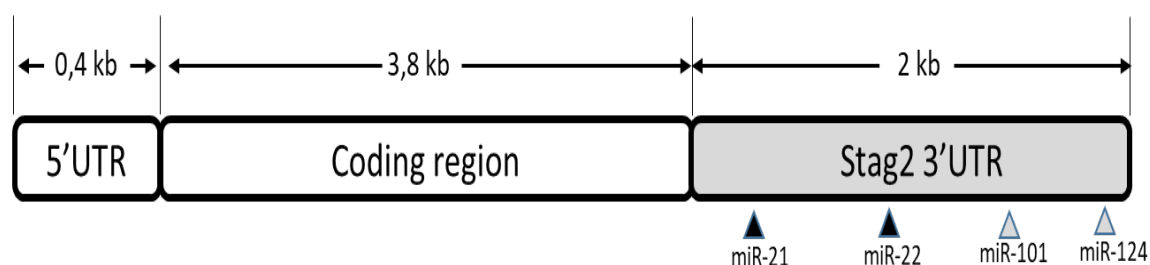
Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων συνιστούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD). Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 6.

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο εκάστοτε δείγμα και το δείγμα-μάρτυρα προσδιορίστηκαν με εφαρμογή του Student's t-test (όταν συγκρίνονταν 2 ομάδες αποτελεσμάτων). Σε κάθε περίπτωση, ως στατιστικά σημαντικές κρίθηκαν οι τιμές για τις οποίες ισχύει: $p < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Το 3' UTR του *Stag2* mRNA αποτελεί στόχο αρκετών microRNAs

Η διασταύρωση των αποτελεσμάτων, των δύο προγραμμάτων πρόβλεψης πιθανών θέσεων αλληλεπίδρασης των microRNAs με το 3' UTR του *Stag2* mRNA (TargetScan και miRanda) έδειξαν ότι αποτελεί στόχο αρκετών microRNAs. Από αυτά τα microRNAs που προβλέφθηκαν, μελετήθηκαν περαιτέρω εκείνα τα οποία είχαν τη μεγαλύτερη συγγένεια και συμπληρωματικότητα ως προς τις βάσεις στην δισδιάστατη αλλά και ως προς την τρισδιάστατη μορφή με το mRNA του *Stag2*. Τα microRNAs αυτά ήταν τα : miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση του mRNA του *Stag2*, των microRNAs και των θέσεων πρόσδεσής τους στο mRNA του *Stag2*. Με τα χρωματιστά τρίγωνα φαίνονται τα 4 miRNAs, τα οποία πιθανόν να αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με το 3'UTR.

3.2 Ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης

Τα περισσότερα πειράματα έγιναν σε δύο κυτταρικές σειρές για μεγαλύτερη ακρίβεια και στατιστική σημαντικότητα. Οι δύο κυτταρικές σειρές ήταν τα HEK293A και U2OS κύτταρα. Τα HEK293A επιλέχθηκαν γιατί υπάρχει μεγάλη ενδογενής ποσότητα της STAG2 πρωτεΐνης και τα U2OS γιατί έχουν μεγάλη ενδογενή συγκέντρωση του miR-21.

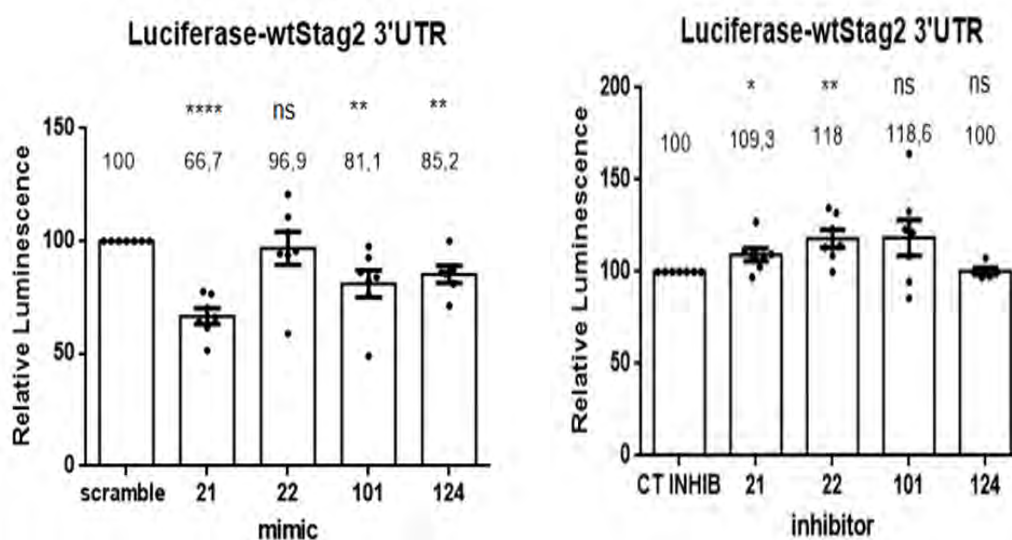
Για να ελεγχθεί αν τα miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 αλληλοεπιδρούν με το 3'UTR του mRNA του *Stag2* και πιθανώς να οδηγούν στην μείωση του φυσιολογικά μέσω της RNA αποσιώπησης, κατασκευάστηκαν 2 φορείς psi-CHECKTM2. Ο πρώτος περιείχε το αγρίου τύπου 3'UTR του *Stag2* mRNA καθοδικά του γονιδίου της

λουσιφεράσης Renilla. Ο δεύτερος περιείχε μεταλλαγμένο το 3'UTR του Stag2 mRNA έτσι ώστε να μην μπορούν να προσδεθούν πάνω του τα microRNAs. Με τον πρώτο φορέα psi-CHECKTM2 που φέρει το αγρίου τύπου (wild-type) 3'UTR του Stag2 περιμένουμε μείωση στην έκφραση της λουσιφεράσης με τα microRNA που στοχεύουν το 3'UTR του Stag2 mRNA, ενώ με τον δεύτερο φορέα psi-CHECKTM2 που φέρει μεταλλαγμένο το 3'UTR του Stag2 δεν περιμένουμε να δούμε μείωση στην έκφραση της λουσιφεράσης επειδή τα microRNA δεν μπορούν να προσδεθούν πάνω του και έτσι επιβεβαιώνεται ότι η μείωση της έκφρασης της λουσιφεράσης του πρώτου φορέα γίνεται ειδικά από τα microRNA.

Το γονίδιο της λουσιφεράσης Firefly αποτέλεσε τον εσωτερικό μάρτυρα για την κανονικοποίηση του σήματος της λουσιφεράσης Renilla. Οι παραπάνω φορείς χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση των κυττάρων HEK293A και U2OS μαζί με την προσθήκη των ολιγονουκλεοτιδίων (oligos) που μιμούνται την δράση των ενδογενών miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 (mimics) και έχουν την ίδια αλληλουχία με αυτά, καθώς και με την προσθήκη των ολιγονουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικά με τα ενδογενή miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 με αποτέλεσμα να σταματάνε την δράση τους (inhibitors, anti-sense oligos). Ως μάρτυρες ελέγχου για την ομάδα ολιγονουκλεοτιδίων των mimics και των inhibitors microRNA χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές γνωστές συνθετικές αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων, που είχαν ελάχιστη έως μηδενική συμπληρωματικότητα ως προς το 3'UTR του Stag2 αλλά και ως προς τα ενδογενή mRNA. Θεωρητικά, εάν τα microRNA αυτά έχουν ως στόχο το mRNA του Stag2, τότε θα περιμένουμε να δούμε μείωση σε σχέση με τους μάρτυρες ελέγχου, με την διαμόλυνση με τα mimics microRNA και αύξηση με τα inhibitors των ενδογενών microRNA, στα πειράματα της λουσιφεράσης, της Real-Time PCR και στο ανοσοστύπωμα κατά Western, στην έκφραση της λουσιφεράσης, στο mRNA του Stag2 και στην πρωτεΐνη STAG2 αντίστοιχα.

3.2.1 Ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης στο wild-type 3'UTR του Stag2

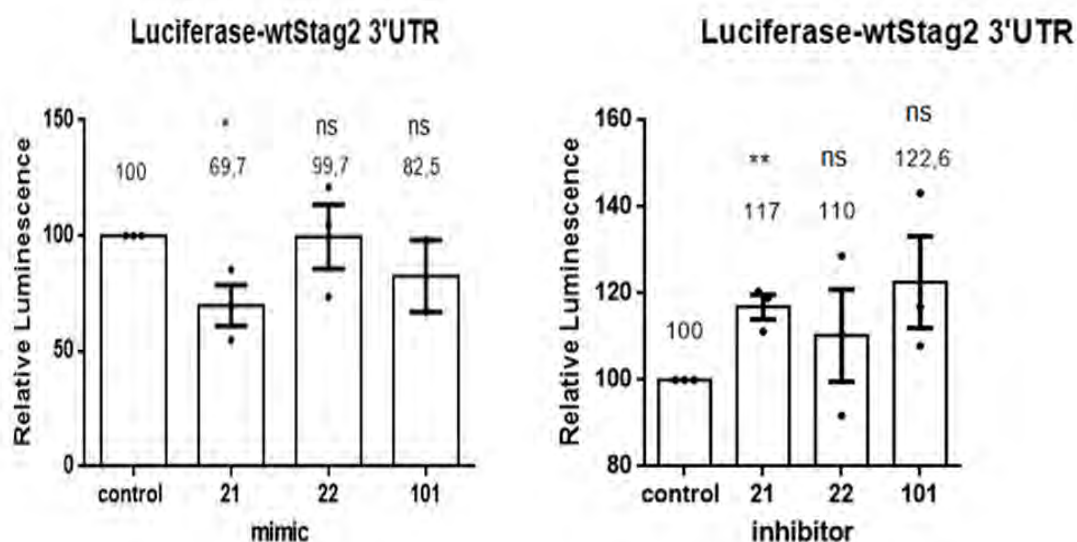
Τα αποτελέσματα της λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK293A ως προς την ομάδα των mimics microRNA αποκάλυψαν ότι τα miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 μειώνουν τα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης σε σχέση με τους μάρτυρες ελέγχου κατά, 33.3%, 3.1%, 18.9% και 14.8% αντίστοιχα (Ραβδόγραμμα 1), ενώ στην ομάδα των inhibitors microRNA η έκφραση της λουσιφεράσης αυξήθηκε από τα miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 κατά 9.3%, 18%, 18.6% και 0% αντίστοιχα σε σχέση με το μάρτυρα ελέγχου (Ραβδόγραμμα 1).



Ραβδόγραμμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού έκφρασης της λουσιφεράσης Renilla έπειτα από διαμόλυνση των HEK293A κυττάρων με τα mimics (αριστερά) και τα inhibitors (δεξιά) microRNA και του psi-CHECKTM2 που φέρει το αγρίου τύπου 3'UTR του Stag2 mRNA. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο 7 πειραμάτων (*= P>0,05).

Τα αποτελέσματα της λουσιφεράσης στα κύτταρα U2OS ως προς την ομάδα των mimics microRNA αποκάλυψαν ότι, τα miR-21, miR-22 και miR-101 μείωσαν τα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης σε σχέση με τον μάρτυρα ελέγχου κατά, 30.3%, 0.3% και 17.5% αντίστοιχα (Ραβδόγραμμα 3), ενώ στην ομάδα των inhibitors microRNA η έκφραση της λουσιφεράσης αυξήθηκε από τα miR-21, miR-22 και miR-

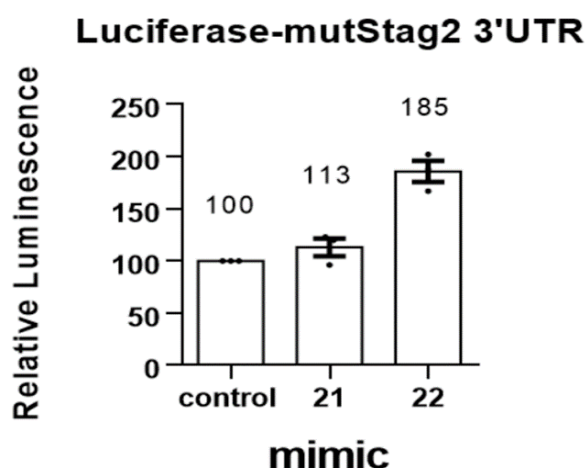
101 κατά 17%, 10% και 22.6% αντίστοιχα σε σχέση με τον μάρτυρα ελέγχου (Ραβδόγραμμα 2).



Ραβδόγραμμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού έκφρασης της λουσιφεράσης Renilla έπειτα από διαμόλυνση των U2OS κυττάρων με τα mimics (αριστερά) και τα Inhibitors (δεξιά) microRNA και του psi-CHECK™2 που φέρει το αγρίου τύπου 3'UTR του *Stag2* mRNA. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο 3 πειραμάτων (*= $P > 0,05$).

3.2.2 Ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης στο mutant 3'UTR του *Stag2*

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων λουσιφεράσης χρησιμοποιώντας τον psi-CHECK™2 φορέα που φέρει το μεταλλαγμένο 3'UTR του *Stag2* δεν έδειξε μείωση στην έκφραση της λουσιφεράσης σε σχέση με τον μάρτυρα ελέγχου. Αυτό σημαίνει ότι η μείωση που παρατηρήθηκε από τον πρώτο φορέα του αγρίου τύπου 3'UTR του *Stag2* mRNA ήταν ειδική και οφειλόταν στην διαμόλυνση με το miR-21. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε μείωση ούτε με το miR-22 (Ραβδόγραμμα 4).

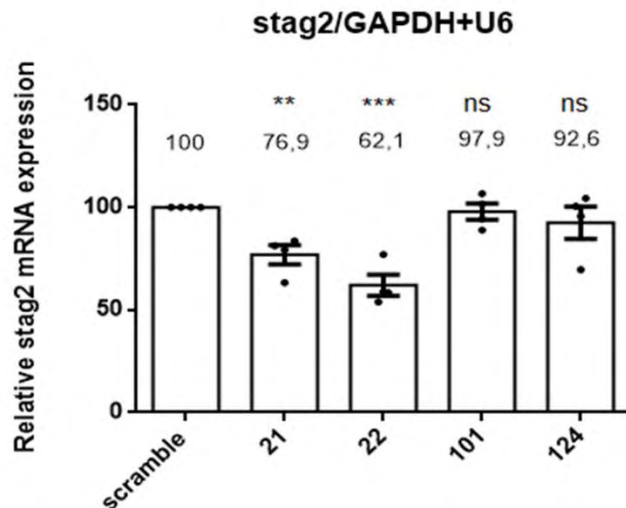


Ραβδόγραμμα 3. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού έκφρασης του mRNA του *Stag2* έπειτα από διαμόλυνση των HEK293A κυττάρων με τα mimics των microRNA. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο 3 πειραμάτων (*= $P > 0,05$).

3.3 Μελέτη της δράσης των microRNA στα ενδογενή επίπεδα του *Stag2* mRNA

Για τη μελέτη της δράσης που μπορεί να έχουν τα miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 στα ενδογενή επίπεδα του *Stag2* mRNA, έγινε διαμόλυνση των κυττάρων HEK293A με τα mimics και inhibitors των miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 και στη συνέχεια απομονώθηκε το συνολικό RNA από τα κύτταρα. Κατόπιν έγινε αντίστροφη μεταγραφή και real-time PCR. Το γονίδιο του U6 rRNA και του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς, για την κανονικοποίηση των επιπέδων της έκφρασης του *Stag2* mRNA στα διαφορετικά δείγματα.

Τα αποτελέσματα της real-time PCR έδειξαν ότι τα ενδογενή επίπεδα του mRNA του *Stag2* μειώνονται με την διαμόλυνση ορισμένων από τα mimics των microRNA στα HEK293A κύτταρα. Τα miR-21 και miR-22 ρίχνουν σημαντικά τα επίπεδα του mRNA του *Stag2* κατά 23.1% και 37.9%, αντίστοιχα σε σχέση με τον μάρτυρα ελέγχου, ενώ τα miR-101 και miR-124 δεν φαίνεται να έχουν κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση στο mRNA του *Stag2* (Ραβδόγραμμα 4).



Ραβδόγραμμα 4. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού έκφρασης του mRNA του *Stag2* έπειτα από διαμόλυνση των HEK293A κυττάρων με τα mimics των microRNA. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο 4 πειραμάτων (*= P>0,05).

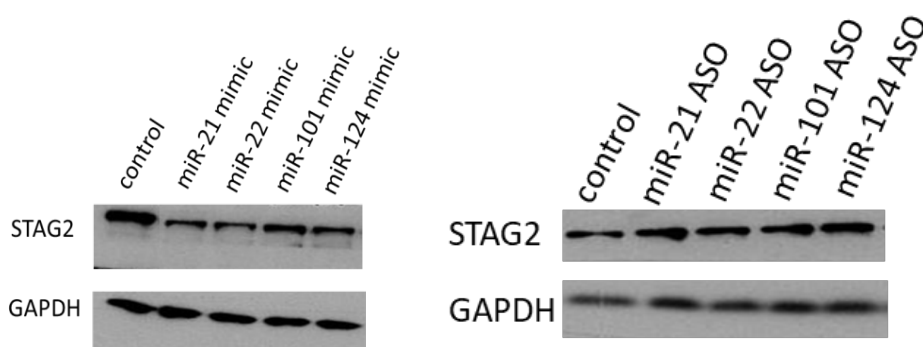
Τα αποτελέσματα της real-time PCR για τα επίπεδα του mRNA του Stag2 μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με inhibitors των microRNA δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τον μάρτυρα ελέγχου (data not shown). Αυτό μάλλον οφείλεται στη μικρή συγκέντρωση των ενδογενών miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 στα κύτταρα HEK293A, με αποτέλεσμα να μην βλέπουμε μεγάλες διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα ελέγχου.

3.4 Μελέτη της δράσης των microRNA στα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης STAG2

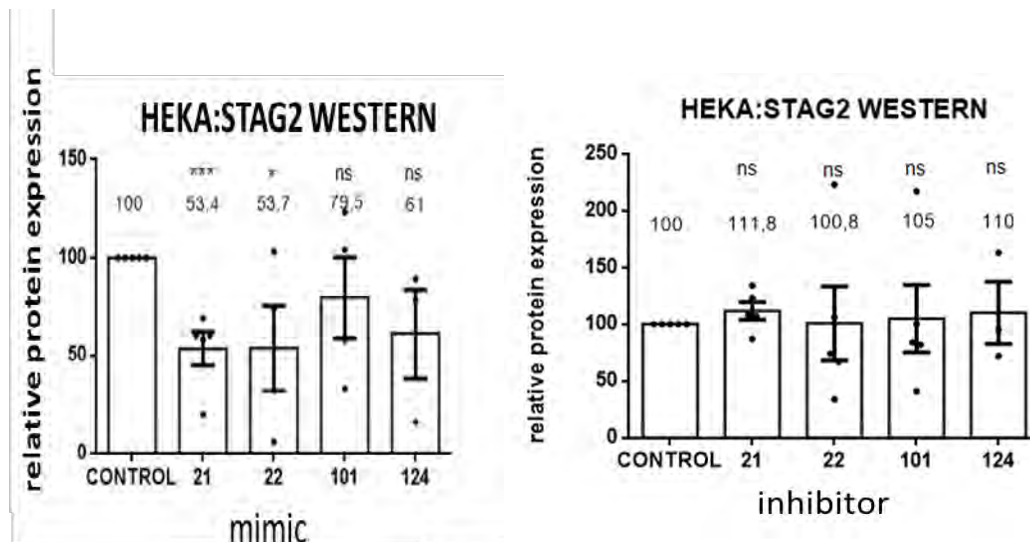
Για τη μελέτη της δράσης που μπορεί να έχουν τα miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 στα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης STAG2, έγινε διαμόλυνση των κυττάρων HEK293A και U2OS με τα ολιγονουκλεοτίδια των mimics ή inhibitors των miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 και κατόπιν πραγματοποιήθηκε ανοσοσύτρωμα κατά Western, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης STAG2. Τα πειράματα αυτά έγιναν πάλι στις δύο κυτταρικές σειρές HEK293A και U2OS. Ως μάρτυρες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν γνωστές αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που έχουν μηδενική συμπληρωματικότητα ως προς το 3'UTR του *Stag2* mRNA αλλά και ως

προς τα περισσότερα ενδογενή mRNA των κυττάρων. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς, για την κανονικοποίηση των επιπέδων των των πρωτεϊνών στα διαφορετικά δείγματα. Τα διαμολυσμένα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο με FBS στους 37C°.

Παρατηρήθηκε ότι η διαμόλυνση των κυττάρων HEK293A με τα mimics των microRNA, προκάλεσε μείωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης STAG2 σε σχέση με το μάρτυρα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα τα miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124 προκάλεσαν πτώση 46.6%, 46.3%, 20.5% και 39%, αντίστοιχα. Όμως, στατιστικά σημαντικά ήταν μόνο τα αποτελέσματα που πήραμε με τα miR-21 και miR-22 (Εικόνα 8, Ραβδόγραμμα 5). Αντίθετα η διαμόλυνση με τα inhibitors των microRNA προκάλεσε μη σημαντική αύξηση στα επίπεδα της STAG2 πρωτεΐνης πιθανώς λόγω της μικρής συγκέντρωσης των ενδοκυτταρικών microRNA, miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124.



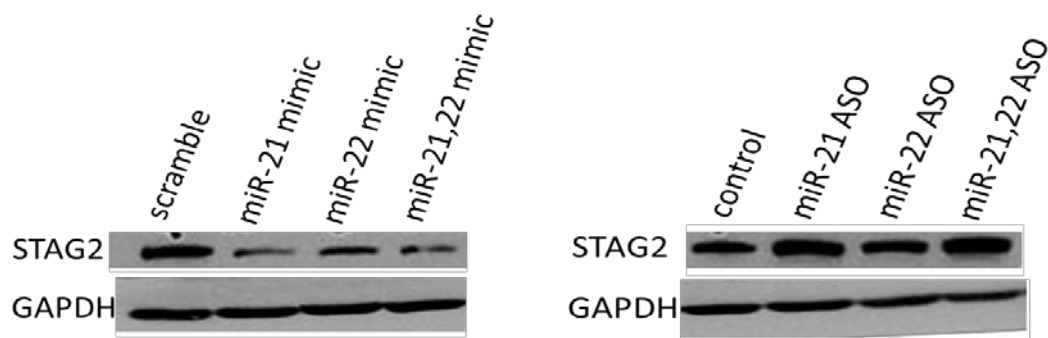
Εικόνα 8. Απεικόνιση των ενδογενών επιπέδων της πρωτεΐνης STAG2 μετά από διαμόλυνση με τα mimics (αριστερά) ή τα inhibitors (δεξιά) των miR-21, miR-22, miR-101, miR-124 στα κύτταρα HEK293A, με τη μέθοδο της ανοσοσύτωσης κατά Western. Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς, για την κανονικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών στα διαφορετικά δείγματα.



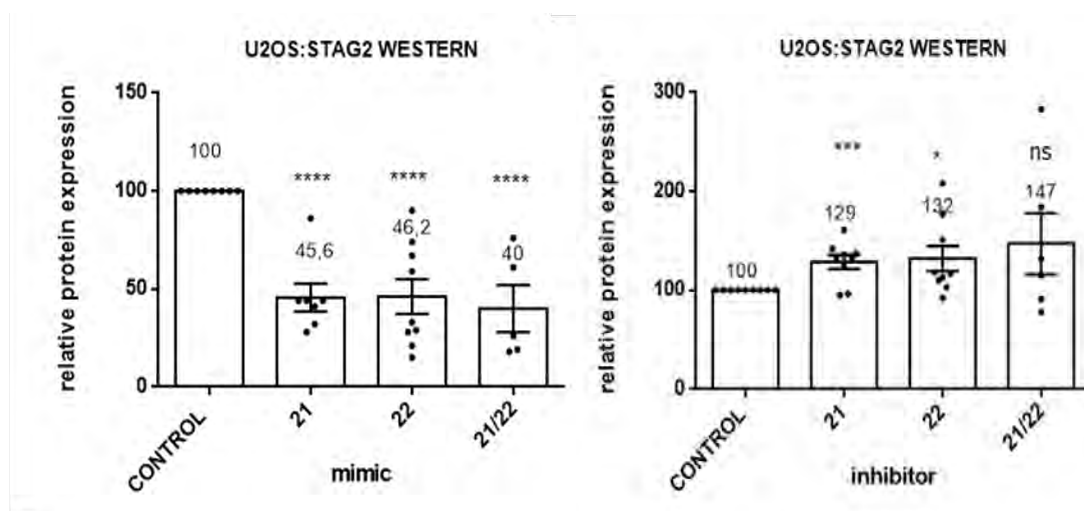
Ραβδόγραμμα 5. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού έκφρασης της πρωτεΐνης STAG2 έπειτα από διαμόλυνση με τα mimics (αριστερά) ή τα inhibitors (δεξιά) των miR-21, miR-22, miR-101 miR-124 στα κύτταρα HEK293A.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα έγινε φανερό ότι από τα 4 αυτά microRNA, πιο μεγάλη επίδραση στο mRNA και την πρωτεΐνη του Stag2 έχουν τα miR-21 και miR-22. Οπότε, μελετήσαμε εκτενέστερα αυτά τα δύο microRNA.

Στα U2OS κύτταρα παρατηρήθηκε ότι η διαμόλυνση των κυττάρων με τα microRNA mimics, προκάλεσε μείωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης STAG2 σε σχέση με τον μάρτυρα ελέγχου με τα miR-21, miR-22 και miR-21/22 να προκαλούν 54.4%, 53.8% και 60% μείωση, αντίστοιχα (Εικόνα 9, Ραβδόγραμμα 7). Αντίθετα η διαμόλυνση με τα inhibitors των microRNA προκάλεσε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της STAG2 πρωτεΐνης με τα miR-21, miR-22, miR-21/22 να την αυξάνουν κατά 29%, 32% και 47%, αντίστοιχα.



Εικόνα 9. Απεικόνιση των ενδογενών επιπέδων της πρωτεΐνης STAG2 μετά από διαμόλυνση με τα miR-21, miR-22 και miR-21/22 mimics (αριστερά) ή τα αντίστοιχα inhibitors (δεξιά) στα κύτταρα U2OS, με τη μέθοδο της ανοσοσύζωσης κατά Western. Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς, για την κανονικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών στα διαφορετικά δείγματα.



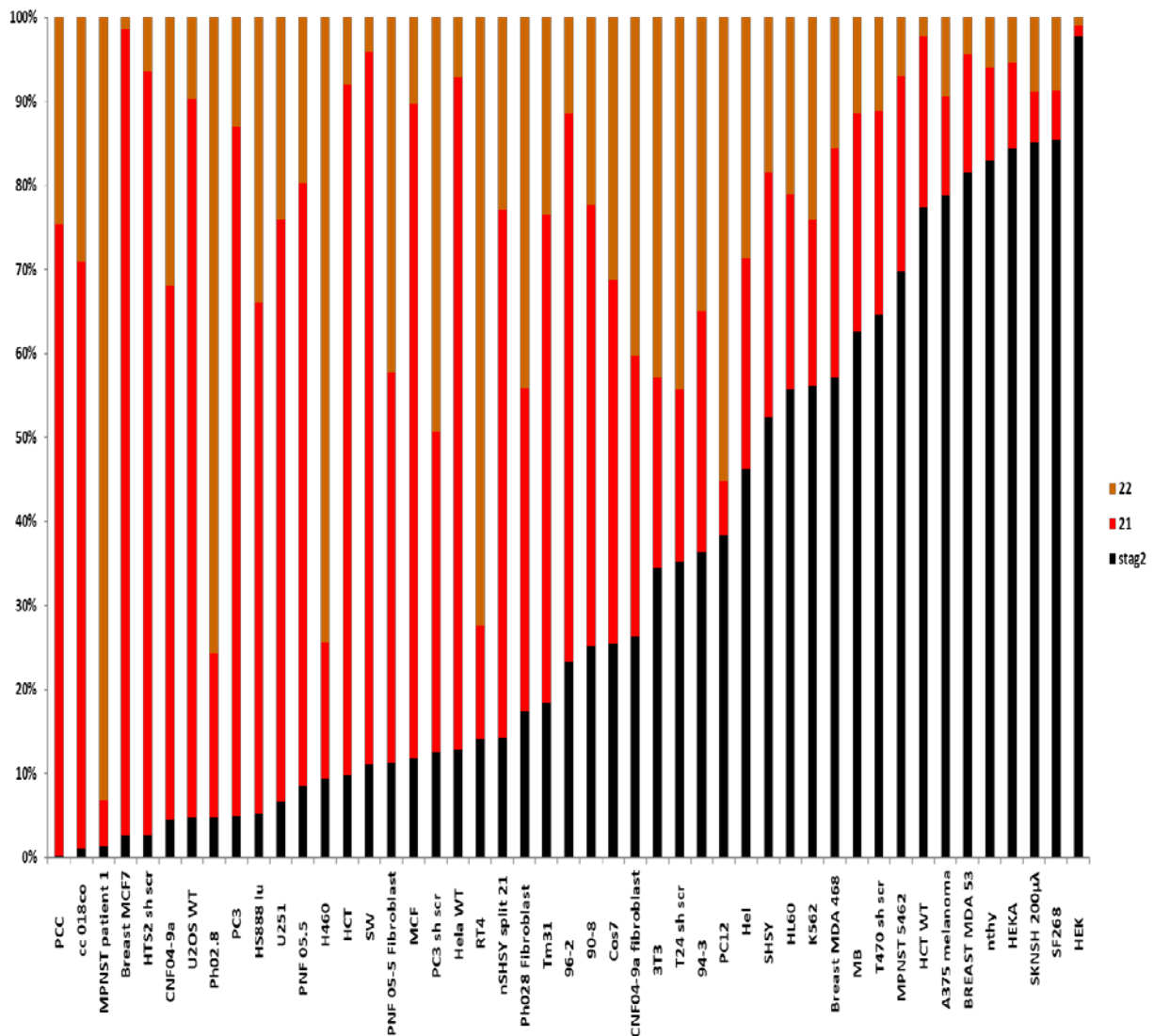
Ραβδόγραμμα 6. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού έκφρασης της πρωτεΐνης STAG2 έπειτα από διαμόλυνση με τα mimics (αριστερά) ή τα inhibitors (δεξιά) των miR-21, miR-22, miR-21/22 στα κύτταρα U2OS.

3.5 Μελέτη της έκφρασης των ενδογενών επιπέδων των microRNAs και του *Stag2* mRNA στις διάφορες κυτταρικές σειρές

Έπειτα, έγιναν πειράματα για να ερευνήσουμε την ενδογενή ποσότητα του mRNA του *Stag2* καθώς και των ενδογενών miR-21 και miR-22 ταυτόχρονα, ώστε να ερευνηθεί εάν υπάρχει όντως κάποια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των ποσοτήτων αυτών φυσιολογικά. Για τη μελέτη των προτύπων έκφρασης των miRNAs και του

Stag2 mRNA σε διάφορες κυτταρικές σειρές, έγινε απομόνωση RNA από τις αντίστοιχες σειρές. Σχεδόν όλες οι κυτταρικές σειρές προέρχονται από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα, καθώς και φυσιολογικά κύτταρα αλλά και κύτταρα από πίθηκο, αρουραίο και ποντίκι. Αρχικά, απομονώθηκε το RNA των κυτταρικών σειρών ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή και RT-PCR χρησιμοποιώντας αντίστροφους εκκινητές, ειδικούς για το *Stag2* mRNA και τα ώριμα miR-21 και miR-22. Τα γονίδια του U6 rRNA και του GAPDH χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς, για την κανονικοποίηση των επιπέδων της έκφρασης του *Stag2* mRNA και των miRNAs στα διαφορετικά δείγματα. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τις σχετικές ποσότητες των *Stag2*, miR-21 και miR-22 ως ποσοστό επί τοις εκατό ανάμεσα στις διάφορες κυτταρικές σειρές (Εικόνα 10).

Παρατηρήθηκε ότι στα HEK293A κύτταρα έχουμε μικρή σχετικά ενδογενή ποσότητα από τα miR-21 και miR-22 σε σχέση με την ποσότητα του mRNA του *Stag2*, ενώ στα U2OS κύτταρα υπάρχει μεγάλη σχετική ενδογενής ποσότητα από τα miR-21 και miR-22 και μικρή του *Stag2* mRNA. Γενικότερα, παρατηρήθηκε μια αντίστροφη σχέση ανάμεσα στις ποσότητες του mRNA του *Stag2* και των miR-21 και miR-22, κάτι το οποίο είναι μία ένδειξη ότι τα επίπεδα του STAG2 ελέγχονται φυσιολογικά από αυτά τα microRNA. Επιπλέον, βλέπουμε ότι η έκφραση του miR-21 είναι μεγαλύτερη από αυτή του miR-22 στις διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως είναι αναμενόμενο για ένα oncomiR (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης των ενδογενών επιπέδων του *Stag2* mRNA και των miR-21 και miR-22 στις 47 διαφορετικές κυτταρικές σειρές, με Real Time PCR. Το γονίδιο του U6 rRNA και του GAPDH χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς, για την κανονικοποίηση των επιπέδων της έκφρασης του *Stag2* mRNA και των microRNAs στα διαφορετικά δείγματα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το σύμπλοκο των κοχρεσινών το οποίο περιγράφηκε πρώτα το 1997, είναι απαραίτητο για την διασφάλιση, του σωστού διαχωρισμού των αδελφών χρωματίδων, στη δομή της χρωματίνης, στην έκφραση γονιδίων και στην επιδιόρθωση του DNA [1], [2]. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τις πρωτεΐνες SMC1, SMC3, RAD21 και μία από τις SCC3, είτε STAG1, είτε STAG2 [41], [42]. Μετά από την ανακάλυψη των μεταλλάξεων στο σύμπλοκο των κοχρεσινών το 2008, πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η απενεργοποίηση ενός ή πολλών γονιδίων των κοχρεσινών είναι ένα σημαντικό και κοινό συμβάν στην παθογένεση πολλών ανθρώπινων καρκίνων [27]. Από αυτά τα γονίδια, το πιο συχνά μεταλλαγμένο ήταν αυτό του *Stag2* το οποίο βρέθηκε μεταλλαγμένο σε πολλούς καρκίνους καθιστώντας το ένα σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο [6], [62]. Όμως, δεν είναι γνωστός μέχρι σήμερα ο τρόπος με τον οποίο οι μεταλλάξεις ή η απώλεια λειτουργίας του *Stag2* μπορεί να οδηγήσουν στον καρκίνο. Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό οδηγούν στην δημιουργία κυττάρων με ανευπλοειδία λόγω του μη σωστού διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων [52]. Μετέπειτα έρευνες έδειξαν ότι υπάρχει μικρή συσχέτιση μεταξύ της μετάλλαξης του *Stag2* στην δημιουργία ανευπλοειδίας και ότι πιθανά η STAG2 πρωτεΐνη είναι αναγκαία γενικότερα στην γονιδιακή ρύθμιση με απορρύθμιση αυτής να οδηγεί στο καρκίνο [55]. Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω έρευνες πάνω στο σύμπλοκο των κοχρεσινών ώστε να γίνει κατανοητός ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο δρα αυτό το μόριο 'κλειδί' στην βιοχημεία και στον φαινότυπο του καρκίνου. Είναι γνωστό ότι τα microRNA παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του καρκίνου ρυθμίζοντας ογκογόνα και ογκοκατασταλτικά γονίδια και βρίσκονται πολλές φορές είτε υπερεκφρασμένα είτε υποεκφρασμένα στους διάφορους καρκίνους [132]. Έτσι, ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να εξεταστεί εάν υπάρχει κάποιος μηχανισμός ρύθμισης του mRNA του *Stag2* από microRNA. Με βιοπληροφορική ανάλυση βρέθηκε ότι το 3'UTR του *Stag2* mRNA είναι στόχος από πολλά microRNA αλλά εμείς ασχοληθήκαμε με αυτά που είχαν την μεγαλύτερη συμπληρωματικότητα και συγγένεια ως προς το 3'UTR του *Stag2* mRNA δηλ. τα miR-21, miR-22, miR-101 και miR-124.

Η ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης κάνοντας χρήση του φορέα με αγρίου τύπου *Stag2* 3'UTR ανέδειξε το mRNA του *Stag2* ως πιθανό στόχο από τα miR-21, miR-101 και miR-124 μετά την διαμόλυνση των κυττάρων με τα mimics και inhibitors των microRNA (Ραβδόγραμμα 1-2). Η ανάλυση με τη μέθοδο της λουσιφεράσης και τον φορέα που έφερε το μεταλλαγμένο 3'UTR του *Stag2*, επιβεβαίωσε ότι το miR-21 ασκεί τη δράση του άμεσα καθώς προσδένεται στο αγρίου τύπου 3'UTR του *Stag2*. Για το miR-22 τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ξεκάθαρα.

Στη συνέχεια με την ανάλυση της real-time PCR βρέθηκε ότι μόνο τα miR-21 και miR-22 μειώνουν τα επίπεδα του mRNA του *Stag2* (Ραβδόγραμμα 3). Με αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα miR-21 και miR-22 συμμετέχουν στην ρύθμιση του *Stag2*. Το miR-21 ρυθμίζει αρνητικά το mRNA του *Stag2* άμεσα μέσω της συμπληρωματικότητας με αυτό, αλλά το miR-22 φαίνεται ότι ρυθμίζει την έκφραση του *Stag2* mRNA όχι μέσω της συμπληρωματικότητας με αυτό αλλά με άλλους έμμεσους τρόπους. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι το miR-22 δεν μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης και άρα δεν προσδένεται στο 3'UTR του *Stag2* mRNA, αλλά μειώνει τα επίπεδα του mRNA στο πείραμα της real-time PCR με κάποιον άλλο μηχανισμό.

Έπειτα, με την ανάλυση κατά Western βρέθηκε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης του STAG2 μειώνονται σημαντικά πάλι μόνο από τα mimics των miR-21 και miR-22 καθώς και υπάρχει σημαντική αύξηση με τα inhibitors miR-21 και miR-22 υποδηλώνοντας έτσι ότι αυτά τα δύο miRNA τελικά ρυθμίζουν τα επίπεδα του mRNA του *Stag2* και της πρωτεΐνης STAG2 (Ραβδόγραμμα 4-5). Τέλος, ερευνήσαμε τα ενδογενή επίπεδα του mRNA του *Stag2* και των ώριμων miR-21, miR-22 σε 47 διαφορετικές κυτταρικές σειρές με real-time PCR για να ερευνηθεί εάν υπάρχει σχέση μεταξύ των ενδογενών ποσοτήτων αυτών. Βρέθηκε ότι υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ των ενδογενών επιπέδων του mRNA του *Stag2* και των miR-21, miR-22 υποδηλώνοντας έτσι ότι τα microRNA αυτά ρυθμίζουν αρνητικά το mRNA του *Stag2*. Συμπερασματικά, βρέθηκε ότι το γονίδιο του *Stag2* μπορεί να ρυθμίζεται μετα-μεταγραφικά από τα miR-21 και miR-22 και ότι μπορεί απορρύθμιση αυτού του μηχανισμού να παίζει ρόλο στην αποσιώπηση της έκφρασης του *Stag2* στο καρκίνο.

4.1 Μελλοντικές Μελέτες

Όλα τα παραπάνω πειράματα είναι ισχυρές ενδείξεις ότι τα miR-21 και miR-22 προσδένονται στο 3' άκρο του mRNA του *Stag2* και ρυθμίζουν αρνητικά τα mRNA και πρωτεϊνικά επίπεδα του *Stag2*.

Μία περαιτέρω μελέτη που θα μπορούσε να γίνει είναι η ανάλυση των κυττάρων με καρυότυπο ώστε να ερευνηθεί εάν τα miR-21 και miR-22 είναι ικανά να προκαλέσουν χρωμοσωμική αστάθεια και ανευπλοειδία στα κύτταρα μέσω της αποσιώπησης του *Stag2*. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με την διαμόλυνση των κυττάρων με τα mimics και inhibitors των miR-21 και miR-22 και να γίνει ανάλυση του καρυότυπου των κυττάρων αυτών. Τα αποτελέσματα που περιμένουμε να πάρουμε θα είναι ότι με τα mimics των miR-21 και miR-22 θα δούμε περισσότερα κύτταρα με ανευπλοειδίες σε σχέση με τον μάρτυρα ελέγχου, ενώ με τα inhibitors των miR-21 και miR-22 περιμένουμε να δούμε λιγότερα κύτταρα με ανευπλοειδίες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] J. H. I. Haarhuis, A. M. O. Elbatsh, and B. D. Rowland, "Cohesin and its regulation: on the logic of X-shaped chromosomes.," *Dev. Cell*, vol. 31, no. 1, pp. 7–18, Oct. 2014.
- [2] J.-M. Peters and T. Nishiyama, "Sister Chromatid Cohesion," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 11, pp. a011130–a011130, Nov. 2012.
- [3] C. Kandoth *et al.*, "Mutational landscape and significance across 12 major cancer types," *Nature*, vol. 502, no. 7471, pp. 333–339, Oct. 2013.
- [4] M. S. Lawrence *et al.*, "Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types," *Nature*, vol. 505, no. 7484, pp. 495–501, Jan. 2014.
- [5] M. D. M. Leiserson *et al.*, "Pan-cancer network analysis identifies combinations of rare somatic mutations across pathways and protein complexes," *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 2, pp. 106–114, Feb. 2015.
- [6] V. K. Hill, J.-S. Kim, and T. Waldman, "Cohesin mutations in human cancer," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1866, no. 1, pp. 1–11, Aug. 2016.
- [7] S. Gard *et al.*, "Cohesinopathy mutations disrupt the subnuclear organization of chromatin," *J. Cell Biol.*, vol. 187, no. 4, pp. 455–462, 2009.
- [8] P. van der Lelij *et al.*, "Warsaw Breakage Syndrome, a Cohesinopathy Associated with Mutations in the XPD Helicase Family Member DDX11/ChlR1," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 86, no. 2, pp. 262–266, 2010.
- [9] P. van der Lelij *et al.*, "The Cellular Phenotype of Roberts Syndrome Fibroblasts as Revealed by Ectopic Expression of ESCO2," *PLoS One*, vol. 4, no. 9, pp. 1–11, 2009.
- [10] C. Michaelis, R. Ciosk, and K. Nasmyth, "Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids.," *Cell*, vol. 91, no. 1, pp. 35–45, Oct. 1997.
- [11] V. Guacci, D. Koshland, and A. Strunnikov, "A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*," *Cell*, vol. 91, no. 1, pp. 47–57, Oct. 1997.
- [12] K. Nasmyth, "Segregating Sister Genomes: The Molecular Biology of Chromosome Separation," *Science (80-.)*, vol. 297, no. 5581, pp. 559–565, Jul. 2002.
- [13] Y. Murayama and F. Uhlmann, "Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring," *Nature*, vol. 505, no. 7483, pp. 367–371, 2014.
- [14] A. Tedeschi, G. Wutz, S. Huet, M. Jaritz, F. De Médecine, and F.- Rennes, "Europe PMC Funders Group Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation," vol. 501, no. 7468, pp. 564–568, 2018.
- [15] T. Nishiyama *et al.*, "Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl," *Cell*, vol. 143, no. 5, pp. 737–749, 2010.
- [16] T. S. Kitajima, S. A. Kawashima, and Y. Watanabe, "The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis," *Nature*, vol. 427, p. 510, Jan. 2004.
- [17] A. L. Marston, W.-H. Tham, H. Shah, and A. Amon, "A Genome-Wide Screen Identifies Genes Required for Centromeric Cohesion," *Science (80-.)*, vol. 303, no. 5662, p. 1367 LP-1370, Feb. 2004.
- [18] K. P. Rabitsch, J. Gregan, A. Schleiffer, J. P. Javerzat, F. Eisenhaber, and K. Nasmyth, "Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II," *Curr. Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 287–301, 2004.
- [19] A. Salic, J. C. Waters, and T. J. Mitchison, "Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis," *Cell*, vol. 118, no. 5, pp. 567–578, 2004.
- [20] F. Uhlmann and K. Nasmyth, "Cohesion between sister chromatids must be

- established during DNA replication," *Curr. Biol.*, vol. 8, no. 20, pp. 1095–1102, 1998.
- [21] F. Uhlmann, F. Lottspeich, and K. Nasmyth, "Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1," *Nature*, vol. 400, p. 37, Jul. 1999.
 - [22] M. Nakajima, K. Kumada, K. Hatakeyama, T. Noda, J.-M. Peters, and T. Hirota, "The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase," *J. Cell Sci.*, vol. 120, no. 23, pp. 4188–4196, 2007.
 - [23] M. De Koninck and A. Losada, "Cohesin Mutations in Cancer. - PubMed - NCBI," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 6, no. 12, p. a026476, 2016.
 - [24] E. Sonoda *et al.*, "Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells.," *Dev. Cell*, vol. 1, no. 6, pp. 759–70, Dec. 2001.
 - [25] S. Vass *et al.*, "Depletion of Rad21/Scc1 in Drosophila cells leads to instability of the cohesin complex and disruption of mitotic progression.," *Curr. Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 208–18, Feb. 2003.
 - [26] Y. Toyoda and M. Yanagida, "Coordinated Requirements of Human Topo II and Cohesin for Metaphase Centromere Alignment under Mad2-dependent Spindle Checkpoint Surveillance," *Mol. Biol. Cell*, vol. 17, no. 5, pp. 2287–2302, May 2006.
 - [27] T. D. Barber *et al.*, "Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 9, pp. 3443–8, Mar. 2008.
 - [28] D. A. Solomon *et al.*, "Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 12, pp. 1428–1430, 2013.
 - [29] S. Covo, C. M. Puccia, J. L. Argueso, D. A. Gordenin, and M. A. Resnick, "The Sister Chromatid Cohesion Pathway Suppresses Multiple Chromosome Gain and Chromosome Amplification," *Genetics*, vol. 196, no. 2, pp. 373–384, Feb. 2014.
 - [30] T. Sakuno, K. Tada, and Y. Watanabe, "Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere," *Nature*, vol. 458, no. 7240, pp. 852–858, Apr. 2009.
 - [31] C. Sjögren and K. Nasmyth, "Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*," *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 12, pp. 991–995, 2001.
 - [32] J. Schmitz, E. Watrin, P. Lénárt, K. Mechtler, and J.-M. Peters, "Sororin Is Required for Stable Binding of Cohesin to Chromatin and for Sister Chromatid Cohesion in Interphase," *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 7, pp. 630–636, Apr. 2007.
 - [33] J. M. Heidinger-Pauli, O. Mert, C. Davenport, V. Guacci, and D. Koshland, "Systematic reduction of cohesin differentially affects chromosome segregation, condensation, and DNA repair.," *Curr. Biol.*, vol. 20, no. 10, pp. 957–63, May 2010.
 - [34] H. Xu *et al.*, "Rad21-cohesin haploinsufficiency impedes DNA repair and enhances gastrointestinal radiosensitivity in mice.," *PLoS One*, vol. 5, no. 8, p. e12112, Aug. 2010.
 - [35] N. Wu *et al.*, "Scc1 sumoylation by Mms21 promotes sister chromatid recombination through counteracting Wapl.," *Genes Dev.*, vol. 26, no. 13, pp. 1473–85, Jul. 2012.
 - [36] G. D. Mehta, R. Kumar, S. Srivastava, and S. K. Ghosh, "Cohesin: Functions beyond sister chromatid cohesion," *FEBS Lett.*, vol. 587, no. 15, pp. 2299–2312, 2013.
 - [37] T. Eng, V. Guacci, and D. Koshland, "Interallelic complementation provides functional evidence for cohesin-cohesin interactions on DNA.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 26, no. 23, pp. 4224–35, Nov. 2015.
 - [38] S. Gruber, C. H. Haering, and K. Nasmyth, "Chromosomal cohesin forms a ring.," *Cell*, vol. 112, no. 6, pp. 765–77, Mar. 2003.
 - [39] J.-M. Peters, A. Tedeschi, and J. Schmitz, "The cohesin complex and its roles in chromosome biology," *Genes Dev.*, vol. 22, no. 22, pp. 3089–3114, Nov. 2008.

- [40] F. Klein *et al.*, "NIH Public Access," *Mutat Res Fund Mol Mech Mutagen*, vol. 15, no. March, pp. 399–410, 2005.
- [41] A. Losada, T. Yokochi, R. Kobayashi, and T. Hirano, "Identification and characterization of SA/Scs3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes," *J. Cell Biol.*, vol. 150, no. 3, pp. 405–416, 2000.
- [42] I. Sumara, E. Vorlauffer, C. Gieffers, B. H. Peters, and J. M. Peters, "Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase," *J. Cell Biol.*, vol. 151, no. 4, pp. 749–761, 2000.
- [43] S. Canudas and S. Smith, "Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scs3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells," *J. Cell Biol.*, vol. 187, no. 2, pp. 165–173, 2009.
- [44] J. Holzmann, J. Fuchs, P. Pichler, J. M. Peters, and K. Mechtler, "Lesson from the stoichiometry determination of the cohesin complex: A short protease mediated elution increases the recovery from cross-linked antibody-conjugated beads," *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 780–789, 2011.
- [45] R. Garcia-Cruz *et al.*, "Dynamics of cohesin proteins REC8, STAG3, SMC1 β and SMC3 are consistent with a role in sister chromatid cohesion during meiosis in human oocytes," *Hum. Reprod.*, vol. 25, no. 9, pp. 2316–2327, 2010.
- [46] S. Caburet *et al.*, "Mutant Cohesin in Premature Ovarian Failure," *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 10, pp. 943–949, 2014.
- [47] L. Carramolino *et al.*, "SA-1, a nuclear protein encoded by one member of a novel gene family: molecular cloning and detection in hemopoietic organs," *Gene*, vol. 195, no. 2, pp. 151–9, Aug. 1997.
- [48] A. Losada, M. Hirano, and T. Hirano, "Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis," *Genes Dev.*, vol. 16, no. 23, pp. 3004–3016, Dec. 2002.
- [49] I. Sumara *et al.*, "The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase," *Mol. Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 515–25, Mar. 2002.
- [50] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–74, Mar. 2011.
- [51] D. J. Gordon, B. Resio, and D. Pellman, "Causes and consequences of aneuploidy in cancer," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, p. 189, Jan. 2012.
- [52] D. A. Solomon *et al.*, "Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer," *Science*, vol. 333, no. 6045, pp. 1039–43, Aug. 2011.
- [53] B. D. Crompton *et al.*, "The Genomic Landscape of Pediatric Ewing Sarcoma," *Cancer Discov.*, vol. 4, no. 11, pp. 1326–1341, Nov. 2014.
- [54] G. Guo *et al.*, "Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 12, pp. 1459–1463, Dec. 2013.
- [55] C. Balbás-Martínez *et al.*, "Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 12, pp. 1464–1469, 2013.
- [56] C. F. Taylor, F. M. Platt, C. D. Hurst, H. H. Thygesen, and M. A. Knowles, "Frequent inactivating mutations of STAG2 in bladder cancer are associated with low tumour grade and stage and inversely related to chromosomal copy number changes," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 23, no. 8, pp. 1964–74, Apr. 2014.
- [57] A. Kon *et al.*, "Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 10, pp. 1232–1237, Oct. 2013.
- [58] F. Thol *et al.*, "Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications," *Blood*, vol. 123, no. 6, pp. 914–920, Feb. 2014.
- [59] S. Thota *et al.*, "Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies," *Blood*, vol. 124, no. 11, pp. 1790–8, Sep. 2014.

- [60] A. S. Brohl *et al.*, "The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation.," *PLoS Genet.*, vol. 10, no. 7, p. e1004475, Jul. 2014.
- [61] F. Tirode *et al.*, "Genomic landscape of ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations," *Cancer Discov.*, vol. 4, no. 11, pp. 1342–1353, 2014.
- [62] P. Black, "Frequent Truncating Mutations of STAG2 in Bladder Cancer," *Urology*, vol. 83, no. 4, pp. 691–692, Apr. 2014.
- [63] J. Gao *et al.*, "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal.," *Sci. Signal.*, vol. 6, no. 269, p. pl1, Apr. 2013.
- [64] E. Cerami *et al.*, "The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data.," *Cancer Discov.*, vol. 2, no. 5, pp. 401–4, May 2012.
- [65] M. De Koninck and A. Losada, "Cohesin Mutations in Cancer.," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 6, no. 12, Dec. 2016.
- [66] P. V Jallepalli *et al.*, "Securin is required for chromosomal stability in human cells.," *Cell*, vol. 105, no. 4, pp. 445–57, May 2001.
- [67] N. Zhang *et al.*, "Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 35, pp. 13033–8, Sep. 2008.
- [68] S. Remeseiro *et al.*, "Cohesin-SA1 deficiency drives aneuploidy and tumourigenesis in mice due to impaired replication of telomeres.," *EMBO J.*, vol. 31, no. 9, pp. 2076–89, May 2012.
- [69] J.-S. Kim *et al.*, "Intact Cohesion, Anaphase, and Chromosome Segregation in Human Cells Harboring Tumor-Derived Mutations in STAG2," *PLOS Genet.*, vol. 12, no. 2, p. e1005865, Feb. 2016.
- [70] G. N. Filippova *et al.*, "An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 2802–13, Jun. 1996.
- [71] E. D. Rubio *et al.*, "CTCF physically links cohesin to chromatin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 24, pp. 8309–14, Jun. 2008.
- [72] J. Chaumeil and J. A. Skok, "The role of CTCF in regulating V(D)J recombination.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 24, no. 2, pp. 153–9, Apr. 2012.
- [73] C.-T. Ong and V. G. Corces, "CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 15, no. 4, pp. 234–46, Apr. 2014.
- [74] J. E. Phillips and V. G. Corces, "CTCF: master weaver of the genome.," *Cell*, vol. 137, no. 7, pp. 1194–211, Jun. 2009.
- [75] V. V Lobanenkov *et al.*, "A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene.," *Oncogene*, vol. 5, no. 12, pp. 1743–53, Dec. 1990.
- [76] R. Katainen *et al.*, "CTCF/cohesin-binding sites are frequently mutated in cancer," *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 7, pp. 818–821, Jul. 2015.
- [77] J. M. Downen *et al.*, "Control of cell identity genes occurs in insulated neighborhoods in mammalian chromosomes.," *Cell*, vol. 159, no. 2, pp. 374–387, Oct. 2014.
- [78] D. Schmidt *et al.*, "A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription.," *Genome Res.*, vol. 20, no. 5, pp. 578–88, May 2010.
- [79] V. Parelho *et al.*, "Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms," *Cell*, vol. 132, no. 3, pp. 422–433, Feb. 2008.
- [80] K. S. Wendt *et al.*, "Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding

- factor," *Nature*, vol. 451, no. 7180, pp. 796–801, Feb. 2008.
- [81] T. Xiao, J. Wallace, and G. Felsenfeld, "Specific sites in the C terminus of CTCF interact with the SA2 subunit of the cohesin complex and are required for cohesin-dependent insulation activity.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 11, pp. 2174–83, Jun. 2011.
 - [82] S. Remeseiro, A. Cuadrado, G. Gómez-López, D. G. Pisano, and A. Losada, "A unique role of cohesin-SA1 in gene regulation and development.," *EMBO J.*, vol. 31, no. 9, pp. 2090–102, May 2012.
 - [83] W. A. Flavahan *et al.*, "Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas.," *Nature*, vol. 529, no. 7584, pp. 110–4, Jan. 2016.
 - [84] J. Mullenders *et al.*, "Cohesin loss alters adult hematopoietic stem cell homeostasis, leading to myeloproliferative neoplasms.," *J. Exp. Med.*, vol. 212, no. 11, pp. 1833–50, Oct. 2015.
 - [85] V. Ambros, "The functions of animal microRNAs," *Nature*, vol. 431, no. 7006, pp. 350–355, Sep. 2004.
 - [86] D. P. Bartel, "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 281–97, Jan. 2004.
 - [87] D. P. Bartel, "Metazoan MicroRNAs," *Cell*, vol. 173, no. 1, pp. 20–51, Mar. 2018.
 - [88] N. Rajewsky, "L(ou)sy miRNA targets?," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 13, no. 9, pp. 754–755, Sep. 2006.
 - [89] N. Rajewsky, "microRNA target predictions in animals," *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 6s, pp. S8–S13, Jun. 2006.
 - [90] W. Liu, S.-Y. Mao, and W.-Y. Zhu, "Impact of tiny miRNAs on cancers.," *World J. Gastroenterol.*, vol. 13, no. 4, pp. 497–502, Jan. 2007.
 - [91] E. Berezikov, V. Guryev, J. van de Belt, E. Wienholds, R. H. A. Plasterk, and E. Cuppen, "Phylogenetic Shadowing and Computational Identification of Human microRNA Genes," *Cell*, vol. 120, no. 1, pp. 21–24, Jan. 2005.
 - [92] J. Stanczyk *et al.*, "Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 58, no. 4, pp. 1001–1009, Apr. 2008.
 - [93] S. Griffiths-Jones, "miRBase: The MicroRNA Sequence Database," in *MicroRNA Protocols*, vol. 342, New Jersey: Humana Press, 2006, pp. 129–138.
 - [94] S. Griffiths-Jones, "The microRNA Registry," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 90001, p. 109D–111, Jan. 2004.
 - [95] S. Griffiths-Jones, H. K. Saini, S. van Dongen, and A. J. Enright, "miRBase: tools for microRNA genomics.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. Database issue, pp. D154–8, Jan. 2008.
 - [96] B. R. Cullen, "Transcription and Processing of Human microRNA Precursors," *Mol. Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 861–865, Dec. 2004.
 - [97] K. Chen and N. Rajewsky, "The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, no. 2, pp. 93–103, Feb. 2007.
 - [98] Q. Jing *et al.*, "Involvement of MicroRNA in AU-Rich Element-Mediated mRNA Instability," *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 623–634, Mar. 2005.
 - [99] S. Djuranovic, A. Nahvi, and R. Green, "miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay.," *Science*, vol. 336, no. 6078, pp. 237–40, Apr. 2012.
 - [100] A. Grimson, K. K.-H. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim, and D. P. Bartel, "MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing," *Mol. Cell*, vol. 27, no. 1, pp. 91–105, Jul. 2007.
 - [101] D. Baek, J. Villén, C. Shin, F. D. Camargo, S. P. Gygi, and D. P. Bartel, "The impact of microRNAs on protein output.," *Nature*, vol. 455, no. 7209, pp. 64–71, Sep. 2008.
 - [102] T. M. Rana, "Illuminating the silence: understanding the structure and function of

- small RNAs," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 23–36, Jan. 2007.
- [103] D. Grün, Y.-L. Wang, D. Langenberger, K. C. Gunsalus, and N. Rajewsky, "microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 1, no. 1, p. e13, Jun. 2005.
- [104] I. G. Cannell, Y. W. Kong, and M. Bushell, "How do microRNAs regulate gene expression?," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 36, no. 6, pp. 1224–1231, Dec. 2008.
- [105] H. Seitz, "Redefining MicroRNA Targets," *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 10, pp. 870–873, May 2009.
- [106] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*," *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843–54, Dec. 1993.
- [107] B. J. Reinhart *et al.*, "The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*," *Nature*, vol. 403, no. 6772, pp. 901–906, Feb. 2000.
- [108] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl, "Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs," *Science (80-.)*, vol. 294, no. 5543, pp. 853–858, Oct. 2001.
- [109] N. C. Lau, L. P. Lim, E. G. Weinstein, and D. P. Bartel, "An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*," *Science (80-.)*, vol. 294, no. 5543, pp. 858–862, Oct. 2001.
- [110] R. C. Lee and V. Ambros, "An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*," *Science (80-.)*, vol. 294, no. 5543, pp. 862–864, Oct. 2001.
- [111] A. Kozomara and S. Griffiths-Jones, "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. Database issue, pp. D152–7, Jan. 2011.
- [112] Z. Mourelatos *et al.*, "miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs," *Genes Dev.*, vol. 16, no. 6, pp. 720–8, Mar. 2002.
- [113] Y. Lee, K. Jeon, J.-T. Lee, S. Kim, and V. N. Kim, "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization," *EMBO J.*, vol. 21, no. 17, pp. 4663–70, Sep. 2002.
- [114] A. Rodriguez, S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst, and A. Bradley, "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units," *Genome Res.*, vol. 14, no. 10A, pp. 1902–10, Oct. 2004.
- [115] Y. Lee *et al.*, "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing," *Nature*, vol. 425, no. 6956, pp. 415–419, Sep. 2003.
- [116] X. Cai, C. H. Hagedorn, and B. R. Cullen, "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs," *RNA*, vol. 10, no. 12, pp. 1957–66, Dec. 2004.
- [117] V. N. Kim, J. Han, and M. C. Siomi, "Biogenesis of small RNAs in animals," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 126–139, Feb. 2009.
- [118] V. N. Kim, "MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export," *Trends Cell Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 156–9, Apr. 2004.
- [119] V. N. Kim, "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 5, pp. 376–385, May 2005.
- [120] Y. Lee *et al.*, "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II," *EMBO J.*, vol. 23, no. 20, pp. 4051–60, Oct. 2004.
- [121] J. Han, Y. Lee, K.-H. Yeom, Y.-K. Kim, H. Jin, and V. N. Kim, "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing," *Genes Dev.*, vol. 18, no. 24, pp. 3016–27, Dec. 2004.
- [122] K.-H. Yeom, Y. Lee, J. Han, M. R. Suh, and V. N. Kim, "Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 16, pp. 4622–9, 2006.

- [123] G. Hutvagner, J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Bálint, T. Tuschl, and P. D. Zamore, "A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA," *Science* (80-.), vol. 293, no. 5531, pp. 834–838, Aug. 2001.
- [124] R. F. Ketting, S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon, and R. H. Plasterk, "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 20, pp. 2654–9, Oct. 2001.
- [125] A. Khvorova, A. Reynolds, and S. D. Jayasena, "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias," *Cell*, vol. 115, no. 2, pp. 209–16, Oct. 2003.
- [126] D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P. D. Zamore, "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex," *Cell*, vol. 115, no. 2, pp. 199–208, Oct. 2003.
- [127] S. Djuranovic, A. Nahvi, and R. Green, "A Parsimonious Model for Gene Regulation by miRNAs," *Science* (80-.), vol. 331, no. 6017, pp. 550–553, Feb. 2011.
- [128] D. P. Bartel, "MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions," *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 215–233, Jan. 2009.
- [129] J. Krol, I. Loedige, and W. Filipowicz, "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 9, pp. 597–610, Sep. 2010.
- [130] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs, "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation," *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 228–234, Mar. 2009.
- [131] P. P. Medina and F. J. Slack, "microRNAs and cancer: an overview," *Cell Cycle*, vol. 7, no. 16, pp. 2485–92, Aug. 2008.
- [132] A. Esquela-Kerscher and F. J. Slack, "Oncomirs — microRNAs with a role in cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 4, pp. 259–269, Apr. 2006.
- [133] P. P. Medina, M. Nolde, and F. J. Slack, "OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma," *Nature*, vol. 467, no. 7311, pp. 86–90, Sep. 2010.
- [134] M. V. Iorio *et al.*, "MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 16, pp. 7065–7070, Aug. 2005.
- [135] M. V. Iorio *et al.*, "MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 18, pp. 8699–8707, Sep. 2007.
- [136] W.-O. Lui, N. Pourmand, B. K. Patterson, and A. Fire, "Patterns of Known and Novel Small RNAs in Human Cervical Cancer," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 13, pp. 6031–6043, Jul. 2007.
- [137] I. A. Asangani *et al.*, "MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer," *Oncogene*, vol. 27, no. 15, pp. 2128–2136, Apr. 2008.
- [138] S. Volinia *et al.*, "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 7, pp. 2257–2261, Feb. 2006.
- [139] F. Meng, R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob, and T. Patel, "MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer," *Gastroenterology*, vol. 133, no. 2, pp. 647–658, Aug. 2007.
- [140] J. A. Chan, A. M. Krichevsky, and K. S. Kosik, "MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 14, pp. 6029–6033, Jul. 2005.
- [141] Y. Hu *et al.*, "Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 128, no. 1, pp. 132–143, Jan. 2011.
- [142] M. T. Tetzlaff *et al.*, "Differential Expression of miRNAs in Papillary Thyroid Carcinoma Compared to Multinodular Goiter Using Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissues," *Endocr. Pathol.*, vol. 18, no. 3, pp. 163–173, Dec. 2007.

- [143] G. A. Calin and C. M. Croce, "MicroRNA signatures in human cancers," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 11, pp. 857–866, Nov. 2006.
- [144] X. Chen *et al.*, "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases," *Cell Res.*, vol. 18, no. 10, pp. 997–1006, Oct. 2008.
- [145] C. H. Lawrie *et al.*, "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma," *Br. J. Haematol.*, vol. 141, no. 5, pp. 672–675, Jun. 2008.
- [146] P. S. Mitchell *et al.*, "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 30, pp. 10513–8, Jul. 2008.
- [147] N. Kosaka, H. Iguchi, and T. Ochiya, "Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis," *Cancer Sci.*, vol. 101, no. 10, pp. 2087–2092, Jul. 2010.
- [148] E. Larrea *et al.*, "New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 5, p. 627, Apr. 2016.
- [149] N. Hosseinahli, M. Aghapour, P. H. G. Duijf, and B. Baradaran, "Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review," *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 8, pp. 5574–5588, Aug. 2018.
- [150] J. Krützfeldt *et al.*, "Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 9, pp. 2885–92, 2007.
- [151] A. G. Bader, D. Brown, and M. Winkler, "The promise of microRNA replacement therapy," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 18, pp. 7027–30, Sep. 2010.
- [152] B. John, A. J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander, and D. S. Marks, "Human MicroRNA Targets," *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 11, p. e363, Oct. 2004.
- [153] A. Krek *et al.*, "Combinatorial microRNA target predictions," *Nat. Genet.*, vol. 37, no. 5, pp. 495–500, May 2005.
- [154] B. P. Lewis, I. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, and C. B. Burge, "Prediction of mammalian microRNA targets," *Cell*, vol. 115, no. 7, pp. 787–98, Dec. 2003.
- [155] M. Maragkakis *et al.*, "DIANA-microT Web server upgrade supports Fly and Worm miRNA target prediction and bibliographic miRNA to disease association," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. suppl, pp. W145–W148, Jul. 2011.
- [156] M. Kertesz, N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul, and E. Segal, "The role of site accessibility in microRNA target recognition," *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 10, pp. 1278–1284, Oct. 2007.
- [157] P. Loher and I. Rigoutsos, "Interactive exploration of RNA22 microRNA target predictions," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 24, pp. 3322–3323, Dec. 2012.